

Entwicklung einer Methode zur Validierung von Immunoassays im Hinblick auf Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekte

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach: Chemie

Spezialisierung: Angewandte Analytik und Umweltchemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Holger Hoffmann

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. U. Panne

2. Prof. Dr. M. W. Linscheid

3. Dr. R. J. Schneider

Tag der mündlichen Prüfung: 07.09.2018

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2013 bis Februar 2017 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Ulrich Panne, Institut für Chemie, Humboldt-Universität zu Berlin, durchgeführt.

Der Wahrheitsbegriff der modernsten Wissenschaften beruht auf einem Modus, den der Wiener Volksmund umschreibt als „einstweilen definitiv“. [...] Wissen ist das, was der öffentlichen Prüfung durch die Gemeinschaft aller Denkender standgehalten hat. Das ist „Maß und Substanz“ der Wissenschaft. Es ist ein pragmatischer Begriff. Er muss sich jedesmal bewähren. So wie sich in der Öffentlichkeit ein Jeder jedesmal bewähren muss.

Jochen Ebmeier, Philosoph und Pädagoge

Danksagung

Zunächst möchte ich den zuständigen Mitarbeitern der Humboldt-Universität zu Berlin danken, welche mir die Möglichkeit gaben Chemie zu studieren, mich zur Promotion zuließen, sowie meine Dissertationsschrift beurteilen. Nur dadurch ist es mir möglich meine Dissertation erfolgreich abzuschließen. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Ulrich Panne, der meine universitäre Betreuung übernahm.

Einen nicht unwichtigeren Anteil am Entstehen und Gelingen dieser Arbeit hat die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM). Nur durch deren Finanzierung, welche eine Arbeitsvergütung, Bereitstellung von Verbrauchsmaterialien und Messgeräte umfasste, konnten die Ergebnisse dieser Dissertation erhalten werden. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Rudolf Schneider, der mir als Vorgesetzter stets die Freiheiten zur Entfaltung meiner Ideen gab. Er ließ sich als Gutachter dieser Arbeit gewinnen und spielte eine wichtige Rolle bei der Publikation der von mir verfassten Manuskripte.

Auch wenn es mir nicht möglich ist sie namentlich zu erwähnen, spielen die Versuchstiere, welche zur Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper dienten, eine entscheidende Rolle in der Generierung der Daten. Sie ließen nicht unmittelbar für die Erarbeitung dieser Dissertation ihr Leben, wurden aber zum Zwecke der Antikörperproduktion immunisiert und getötet. Nur durch ihre Antikörper konnten die verwendeten Immunoassays entwickelt werden, welche die Grundlage dieser Dissertation bilden.

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern der BAM danken, welche durch ihre kollegiale und lösungsorientierte Art ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen. Explizit soll dabei Herr Peter Carl genannt werden, welcher die Idee der Anwendung eines heterologen Tracers hatte. Herr Dr. Lehmann, der sich stets unverzüglich der Lösung technischer Probleme, die durch mich nicht gelöst werden konnten, annahm. Frau Shireen Weise, welche die hochaufgelösten Massenspektren aufnahm. Die verwendeten Bedingungen für den Sulfamethoxazol- und Carbamazepin-ELISA wurden unter anderen von Frau Kristin Hoffmann ausgetestet. Frau Dominique Lörcher betreute die elektrochemischen Synthesen von Transformationsprodukten. Die MALDI-TOF-Messungen wurden von Frau Sabine Flemig durchgeführt. Herr Dr. Dietmar Pfeifer nahm die NMR-Messungen vor. Den durch mich betreuten Masteranden Herrn Christian Knizia, möchte ich ebenfalls danken, der die massenspektrometrischen Messungen und LC-ELISA-Messungen von Estron durchführte. Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Berliner Wasserbetriebe und des Klärwerks Steinhäule in Neu-Ulm, für die Bereitstellung der Abwasserproben.

Kurzzusammenfassung

Immunoassays basieren auf der Anwendung von Antikörpern, welche selektiv den zu messenden Analyten binden. Die Richtigkeit der erhaltenen Ergebnisse hängt maßgeblich von der Selektivität der Antikörper ab und kann durch Interferenzen gestört werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, bei der die Probe mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (LC) in Fraktionen aufgetrennt wird und diese Fraktionen anschließend mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) vermessen werden. Dieses Verfahren wurde als LC-ELISA bezeichnet. Das erhaltene Profil aus im ELISA gemessener Analytkonzentration in Abhängigkeit von der Elutionszeit wurde als LC-ELISAGramm bezeichnet und bietet die Möglichkeit, Interferenzen zu erkennen, welche beim ELISA unentdeckt bleiben.

Als Modellanalyten für die zu untersuchenden ELISAs dienten Sulfamethoxazol (SMX), Carbamazepin (CBZ) und Estron (E1). Dabei wurden verschiedene Umweltmatrices wie Oberflächenwasser und Abwässer mit dem jeweiligen ELISA vermessen. Zur Validierung des LC-ELISAs wurde der Einfluss unterschiedlicher Mikrotiterplatten zur Sammlung der Fraktionen ermittelt. Weiterhin wurden unterschiedlich lange Fraktionierungsintervalle und eine zweidimensionale Flüssigkeitschromatographie eingesetzt. Die Reproduzierbarkeit der erhaltenen LC-ELISAGramme und der Einfluss der Festphasenextraktion zur Probenanreicherung wurden bestimmt. Die Richtigkeit der im LC-ELISA ermittelten Konzentrationen wurde anhand von dotierten Reinstwasserproben und für natürlich belastete Umweltproben durch Vergleich mit einer Referenzmethode, der Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit der Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), untersucht. Dabei zeigte sich im Rahmen der Ergebnisunsicherheit eine gute Übereinstimmung. Die guten Quantifizierungseigenschaften des validierten LC-ELISAs wurden angewendet, um einen Ansatz zur Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Interferenzen in Umweltproben aufzuzeigen. Durch diesen Ansatz und Anwendung der sauren Hydrolyse der Probe war es möglich, einen bisher unbekannten SMX-Metaboliten zu detektieren und dessen wahrscheinliche Kreuzreaktivität mit $460 \pm 150 \%$ abzuschätzen. Des Weiteren wurde der Einfluss des für diesen SMX-ELISA verwendeten Puffers und Tracers getestet. Dabei wurde ein neuer Tracer in einer linearen 13-Stufen-Synthese entwickelt, wobei neuartig die Konjugation der Peroxidase an der *N*¹-Position des SMX erfolgte. Das dafür entwickelte Hapten wurde auch zur Synthese eines neuartigen Immunogens eingesetzt. Zur Identifizierung und Quantifizierung von Kreuzreaktanden wurden die Proben mittels LC-MS/MS unter Anwendung von Strategien zum Target- und Suspected-Target-Screening vermessen.

Abstract

Immunoassays are based on the use of antibodies that selectively bind the analyte. The trueness of the results obtained depends to a great extent on the selectivity of the antibodies and can be affected by interferences. In this study, a method was developed in which the sample is separated into fractions by using high-performance liquid chromatography (LC) and these fractions are measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). This method was referred to as LC-ELISA. The profile obtained from the measured analyte concentration by ELISA as a function of the elution time was referred to as LC-ELISAGram and offers the possibility to detect interferences which otherwise remain undetected during the ELISA.

Sulfamethoxazole (SMX), carbamazepine (CBZ) and estrone (E1) were used as model analytes for the ELISA and LC-ELISA measurements. Various environmental matrices such as surface water and wastewater were examined for their interference in the respective ELISA. For the validation of the LC-ELISA the influence of different 96-well microtiter plates for the collection of the fractions was discussed. The reproducibility of the obtained LC-ELISAGrams and the influence of the solid-phase extraction for sample enrichment were determined. The trueness of the concentrations determined by the LC-ELISA measurements was investigated by spiked ultrapure water samples and for naturally polluted environmental samples by comparison with a reference method, liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). This showed a good agreement of the obtained concentrations, considering also the uncertainty of the results. The good quantification properties of the validated LC-ELISA have been used to demonstrate an approach to distinguish between specific and non-specific interferences from environmental samples. By this approach and application of acidic hydrolysis of the sample, it was possible to detect a previously unknown metabolite of SMX and estimate its cross-reactivity to probably $460 \pm 150\%$. Furthermore, the influence of buffer and tracer on the SMX ELISA was assessed. A new tracer was developed in a linear 13-step synthesis, which resulted in the novel conjugation of the peroxidase at the N^1 -position of SMX. The new hapten was also used for the synthesis of a novel immunogen. For the identification and quantification of cross-reactants, the samples were measured by LC-MS/MS using different approaches such as target and suspected-target screening.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	vii
Kurzzusammenfassung.....	ix
Abstract	xi
Inhaltsverzeichnis.....	xiii
Abkürzungsverzeichnis und Glossar.....	xv
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen.....	xvi
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	1
1.2 Interferenzen bei Verwendung des ELISAs und deren Gründe	6
1.3 Möglichkeiten zur Reduktion von Interferenzen	8
1.4 Identifikation von Interferenzen	10
1.5 Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und ELISA (LC-ELISA)	12
1.6 Modellanalyten und Modellmatrices	15
1.7 Zielsetzung	18
2. Ergebnisse und Diskussion	19
2.1 Validierung des LC-ELISAs	19
2.1.1 Notwendigkeit und Grenzen des LC-ELISAs	19
2.1.2 Kontrollmöglichkeiten innerhalb des LC-ELISAs	21
2.1.3 Präzisionsprofil	25
2.1.4 Leerproben	27
2.1.5 Präzision und Richtigkeit	30
2.1.6 Hochaufgelöste LC-ELISAs.....	34
2.2 Anwendung des LC-ELISAs zur Identifizierung von Interferenzen bei der Vermessung von Umweltproben	37
2.2.1 Einfluss der Anreicherungsart der Probe.....	37
2.2.2 Interferenzprofil von Umweltproben.....	43
2.2.3 Einfluss der sauren Hydrolyse der Probe	48
2.2.4 Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Interferenzen.....	54
2.2.5 Einfluss des Probenpuffers.....	59
2.2.6 Einfluss des Tracers	63
2.2.7 Vermessung von durch elektrochemischer Behandlung erhaltener Syntheseprodukte.....	70

2.3 Anwendung der Massenspektrometrie zur Identifizierung von Interferenzen beim ELISA	73
2.3.1 Target-Screening	73
2.3.2 Suspected-Target-Screening.....	76
2.4 Fließschema zur Validierung von Immunoassays	85
3. Zusammenfassung und Ausblick.....	88
4. Material und Methoden	93
4.1 Geräte und Chemikalien	93
4.2 Pufferlösungen	96
4.3 Probenahme der Umweltproben	96
4.4 Festphasenextraktion	97
4.5 Durchführung des ELISAs	98
4.5.1 ELISA zur Bestimmung von Sulfamethoxazol.....	98
4.5.2 ELISA zur Bestimmung von Estron.....	99
4.5.3 ELISA zur Bestimmung von Carbamazepin.....	99
4.6 LC-Methoden.....	100
4.7 Durchführung der LC-ELISA-Messungen.....	102
4.8 Elektrochemische Synthesen	103
4.9 Synthese des neuartigen Tracers und Immunogens	103
4.10 Synthese von SMX- <i>N</i> ⁴ -Glucuronid	108
4.11 Durchführung der LC-MS/MS-Messungen	108
4.11.1 Quantifizierung von Analyten.....	108
4.11.2 Suspected-Target-Screening.....	111
5. Literatur	112
6. Anhang.....	119

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

ACN – Acetonitril

AcOH – Essigsäure

BSA – Rinderserumalbumin (englisch: bovine serum albumin)

DMAP – 4-(Dimethylamino)-pyridin

ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay (antikörperbasiertes Nachweisverfahren unter Verwendung eines Enzyms zur Signalbildung)

Hapten – ein Derivat des Analyten, welches sich mit anderen Verbindungen wie zum Beispiel Proteinen konjugieren lässt.

Immunogen – Molekül, welches in einem Lebewesen eine Immunantwort auslöst (typischerweise artfremd und mit einer molaren Masse größer als 1000 Dalton)

LC oder HPLC – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

LC-ELISA – Auftrennung von Probeninhaltsstoffen mittels LC und Vermessung der Fraktionen mittels ELISA

LC-ELISAGramm – erhaltenes Profil des LC-ELISAs bei Auftragung der im ELISA gemessenen Analytkonzentrationen in Abhängigkeit von der Elutionszeit der LC-Separation

m/z – Masse-zu-Ladung-Verhältnis

MRM – Multiple Reaction Monitoring (ein Messmodus in dem Ionen, wie Quasi-Molekülionen, innerhalb eines Massenspektrometers mit Gasmolekülen kollidieren und dabei zu Fragmenten, sogenannten Produkt-Ionen, zerfallen)

MRM-Übergang – der Zusammenhang eines Molekülions oder Quasi-Molekülions zu einem seiner Produkt-Ionen (m/z von Quasi-Moleküliion → m/z von Produkt-Ion)

MS bzw. MS/MS – Massenspektrometrie bzw. Tandem-Massenspektrometrie

PBS-Puffer – phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)

POD – Peroxidase

Tracer – ein Konjugat aus dem Analyten und einer signalgebenden Einheit, in dieser Arbeit ein Konjugat mit einer Peroxidase, welche ein farbloses Substrat zu einem gefärbten Produkt oxidiert

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1:	<i>In der Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission hinsichtlich LC-Immunogramme festgelegte Kriterien.....</i>	13
Tabelle 2:	<i>Mittels ELISA und LC-MS/MS quantifizierte Sulfamethoxazolkonzentration in µg/L in Klärwerkszuläufen und -abläufen, wobei für die ELISA-Messungen die Proben unterschiedlich angereichert wurden (Ergebnisse auf einen Anreicherungsfaktor von 1 normiert) sowie das Konzentrationsverhältnis von ELISA (niedrigste gemessene Konzentration) zu LC-MS/MS-Messung.....</i>	19
Tabelle 3:	<i>Gemessene SMX-Konzentration in µg/L der Kalibrierstandards (Kontrolle über Verluste) bei Quantifizierung mittels Kalibrierstandards von der Fraktionierungsplatte bei Verwendung von unbehandelter Platte und glasbeschichteter Platte.....</i>	23
Tabelle 4:	<i>Konzentrationsbereiche in µg/L, die signifikante Aussagen und Quantifizierungen für die in der Arbeit verwendeten Enzyme-linked Immunosorbent Assays zulassen und die Konzentration am Wendepunkt der Kalibrierfunktion (C-Wert).....</i>	27
Tabelle 5:	<i>Ergebnisse zur erhaltenen Korrelation (Ausgleichsfunktion und Bestimmtheitsmaß R^2) bei Auftragung der gemessenen Konzentrationen von Sulfamethoxazol beziehungsweise Estron mittels LC-ELISA gegen LC-MS/MS sowie der Mittelwert der Wiederfindungen.....</i>	32
Tabelle 6:	<i>Durchschnittliche Wiederfindungsraten in % von Sulfamethoxazol bzw. Estron bei Anwendung verschiedener Festphasenextraktionskartuschen (alle 500 mg Sorbensmaterial) zur Anreicherung aus verschiedenen Matrices mit unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren</i>	38
Tabelle 7:	<i>Mittels LC-MS/MS ermittelte Konzentration in ng/L von Sulfamethoxazol und N⁴-Acetyl-Sulfamethoxazol in Abwasserproben sowie die Umsatzrate der durch saure Hydrolyse (16 % HCl) umgesetzten Menge von N⁴-Acetyl-Sulfamethoxazol zu Sulfamethoxazol.....</i>	51
Tabelle 8:	<i>C-Werte der 4-Parameter-Gleichung in µg/L bei Anwendung des alten und neuen Tracers (Verdünnung) unter gleichen Bedingungen und sich dabei ergebene Kreuzreaktivität (KR) für verschiedene Sulfonamide, wobei Succ-SMX für N⁴-Succinimidyl-Sulfamethoxazol (Hapten des alten Tracers) und 11 für das Hapten des neuen Tracers steht.....</i>	66
Tabelle 9:	<i>Mittels LC-MS/MS unter Vergleich zu einem Referenzstandard nachgewiesene Sulfonamide mit Angabe derer Kreuzreaktivität (KR) und deren Auftreten in unterschiedlichen Umweltwasserproben</i>	74
Tabelle 10:	<i>Zuordnung von Oberflächenwasserproben mit Beprobungsort und -datum....</i>	97
Tabelle 11:	<i>Bedingungen der HPLC-Methode 1.....</i>	100
Tabelle 12:	<i>Bedingungen der HPLC-Methode 2.....</i>	100

Tabelle 13:	<i>Bedingungen der HPLC-Methode 3</i>	101
Tabelle 14:	<i>Bedingungen der HPLC-Methode 4</i>	101
Tabelle 15:	<i>Bedingungen der HPLC-Methode 5</i>	101
Tabelle 16:	<i>Daten für die massenspektrometrische Quantifizierung von Sulfamethoxazol und N⁴-Acetyl-SMX</i>	109
Tabelle 17:	<i>Daten für die massenspektrometrische Quantifizierung von Estron</i>	110
Tabelle 18:	<i>Daten für die massenspektrometrische Quantifizierung von Carbamazepin</i>	110
Abbildung 1:	<i>Schematischer Ablauf eines direkten kompetitiven ELISAs</i>	2
Abbildung 2:	<i>Simulierter Verlauf einer Kalibrierfunktion eines direkten ELISAs mit Erklärung der Parameter A, B, C und D aus der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard</i>	4
Abbildung 3:	<i>Simulierter Verlauf der Kalibrierfunktionen zweier Stoffe bei Anpassung mit der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard</i>	7
Abbildung 4:	<i>Schematischer Aufbau des LC-ELISAs</i>	12
Abbildung 5:	<i>LC-ELISAGramm in (A) Balken- und (B) Linienform sowie Überlagerung von LC-ELISAGrammen in (C) Balken- und (D) Linienform</i>	14
Abbildung 6:	<i>Strukturformeln der untersuchten Modellanalyten</i>	15
Abbildung 7:	<i>Schema zum Verlauf der Fraktionssammlung (schwarze Linie), Auftragung von Standards und leere Kavitäten (weiß) mit der Beschreibung ihrer Bedeutung</i>	22
Abbildung 8:	<i>Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen erhalten bei Verwendung von unbehandelter und glasbeschichteter Platte für eine 10-fach angereicherte (A) Klärwerkszulaufprobe und (B) Klärwerksablaufprobe unter Verwendung der HPLC-Methode 1</i>	24
Abbildung 9:	<i>Kalibrierfunktion für den SMX-ELISA (rote Linie) und nach Gleichung 3 errechneten Unsicherheit der Konzentrationen (▼), welche nach Gleichung 4 einer neu entwickelten Anpassungsfunktion verbunden wurden (blaue Linie)</i>	26
Abbildung 10:	<i>LC-ELISAGramm für eine Leerprobe unter Anwendung der HPLC-Methode 1 und Gebrauch des (A) SMX-LC-ELISAs und (B) CBZ-LC-ELISAs</i>	28
Abbildung 11:	<i>E1-LC-ELISAGramm für eine Leerprobe bei Verwendung der HPLC-Methode 1 (grüne Linie) und HPLC-Methode 2 (rote Linie)</i>	28
Abbildung 12:	<i>SMX-LC-ELISAGramm für eine mit SMX dotierte Leerprobe mit Angabe der Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung unter Verwendung der HPLC-Methode 1</i>	31

Abbildung 13: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen für Klärwerksablauf 1 mit einem Fraktionierungsintervall von 9 Sekunden und 3 Sekunden unter Verwendung der HPLC-Methode 1.....	34
Abbildung 14: SMX-LC-ELISAGramm und UV-Chromatogramm, gemessen bei Anwendung von HPLC-Methode 3 für die Fraktion 9-12,5 min, welche bei Fraktionierung der Ablaufprobe 1 unter Anwendung der HPLC-Methode 1 erhalten wurde...	36
Abbildung 15: E1-LC-ELISAGramme von Teltowkanalproben, erhalten nach 200-facher Anreicherung mit (A) Strata-X- und (B) Bakerbond (RP-C18)-Kartuschen unter Verwendung der HPLC-Methode 2	39
Abbildung 16: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule, erhalten bei 10-facher Anreicherung (A) ohne SPE im Druckluftstrom und (B) mit Strata-X-Kartuschen, unter Verwendung der HPLC-Methode 1.....	40
Abbildung 17: Überlagerung von UV-Chromatogrammen von Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule, erhalten nach 50-facher Anreicherung (A) ohne SPE im Druckluftstrom und (B) mit Strata-X-Kartuschen, unter Verwendung der HPLC-Methode 1.....	41
Abbildung 18: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen der (A) 10-facher angereicherten Zulaufproben und (B) 20-fach angereicherte Ablaufproben der 6 Berliner Klärwerke unter Verwendung der HPLC-Methode 1.....	43
Abbildung 19: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen der 50-fach angereicherten Berliner Oberflächenwasserproben unter Verwendung der HPLC-Methode 1	44
Abbildung 20: Überlagerung von E1-LC-ELISAGrammen der mittels Strata-X-Kartuschen (A) 5-fach angereicherten Zulaufproben und (B) 100-fach angereicherten Ablaufproben der 6 Berliner Klärwerke unter Verwendung der HPLC-Methode 2.....	45
Abbildung 21: Überlagerung von CBZ-LC-ELISAGrammen von nicht angereicherten Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule unter Verwendung der HPLC-Methode 4.....	46
Abbildung 22: Gemessene Signalintensität des Massenübergangs 254 → 92 für SMX und 296 → 134 für N ⁴ -Acetyl-SMX bei Inkubation von N ⁴ -Acetyl-SMX in einer 16 %igen HCl-Lösung (mit 15 % MeOH) bei Raumtemperatur.....	49
Abbildung 23: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von 10-fach angereicherten (A) Zulauf 1 und (B) Ablauf 1 nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne HCl unter Verwendung der HPLC-Methode 1	50
Abbildung 24: Gemessene Signalintensität des Massenübergangs 254 → 92 für SMX bei Inkubation der isolierten Fraktion 5,8-6,1 min des Ablaufs 1, erhalten unter Verwendung der HPLC-Methode 1, in einer 5 %igen HCl-Lösung bei Raumtemperatur.....	52

Abbildung 25: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Zulauf 1 nach 24-stündiger Inkubation mit 16 %iger HCl und Vermessung bei unterschiedlichen Anreicherungs-faktoren (erhaltene Ergebnisse auf einen Anreicherungs-faktor von 0,625-fach normiert).....	55
Abbildung 26: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Ablauf 1 bei Anwendung unterschiedlicher Anreicherungs-faktoren (erhaltene Ergebnisse auf einen Anreicherungs-faktor von 5-fach normiert).....	56
Abbildung 27: Kalibrierfunktionen von N ⁴ -Acetyl-SMX, SMX und Sulfachlorpyridazin mit Angabe der entsprechenden Kreuzreaktivität für ausgewählte Konzentrationen im Arbeitsbereich.....	57
Abbildung 28: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Ablauf 1 unter Anwendung unterschiedlicher Probenpufferlösungen für die Wiederaufnahme der getrockneten Fraktionen und Messung im ELISA unter Verwendung der HPLC-Methode 1.....	60
Abbildung 29: Kalibrierfunktionen von SMX gelöst in unterschiedlichen Pufferlösungen, welche auch für die LC-ELISAGramme in Abbildung 28 verwendet wurden ...	60
Abbildung 30: (A) Kalibrierfunktionen von SMX nach Inkubation, der mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte, in den verschiedenen Pufferlösungen, welche auch für die LC-ELISAGramme in Abbildung 28 verwendet wurden. (B) erhaltene Extinktionen nach Inkubation von Tracer-Lösung mit unterschiedlichen Pufferlösungen in einer nicht-bindenden und nicht mit Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte	61
Abbildung 31: N-H-Acidität von Sulfamethoxazol mit pKs von 5,6	62
Abbildung 32: MALDI-TOF-Massenspektrum für den Tracer 13 und ungekoppelte Meerrettichperoxidase	65
Abbildung 33: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Abwasser des Klärwerks Steinhäule nach Nachklärung bei 10-facher Anreicherung, gemessen mit dem alten und dem neuen Tracer unter Verwendung der HPLC-Methode 1.....	68
Abbildung 34: UV-Chromatogramme und LC-ELISAGramme nach oxidativer Behandlung von A) einem SMX-Standard fraktioniert unter Verwendung der HPLC-Methode 1 und B) einem Estron-Standard fraktioniert unter Verwendung der HPLC-Methode 2	71
Abbildung 35: Korrelation von SMX-Äquivalentkonzentration für das Signal im LC-ELISAGramm bei der Elutionszeit um 10 min unter Verwendung der HPLC-Methode 1 und die gemessene Signalintensität des intensivsten MRM-Übergangs des potentiellen SMX-N ⁴ -Glucuronid	77
Abbildung 36: Darstellung von Fragmenten nach der Fragmentierung von SMX [102] sowie drei mögliche Fälle der Metabolisierung und daraus hervorgehende Fragmente	79

Abbildung 37: (A) Darstellung von Signalintensitäten von MRM-Übergängen im positiven (74) und negativen (43) Ionisationsmodus, welche zur Intensität zum Zeitpunkt $t=0$ ins Verhältnis gesetzt wurden und (B) MRM-Übergänge von SMX und diejenigen mit inverser Korrelation zu SMX bei vergleichbarem kinetischen Verlauf	82
Abbildung 38: Fließschema zur Identifizierung und Einordnung von Interferenzen	85
Abbildung A1: Darstellung von SMX und den in der Literatur bisher beschriebenen Haptenstrukturen zur Synthese von Immunogenen oder Tracer für SMX- und Sulfonamid-Immunoassays [94-100].....	119
Abbildung A2: Vereinfachtes Reaktionsschema zur Darstellung des neuen mit Fmoc geschützten Haptens 10 , welches zur Synthese des neuen Tracers 13 und Immunogens 16 verwendet wurde	120
Abbildung A3: Vereinfachtes Reaktionsschema zur Darstellung des neuen Tracers 13 und Immunogens 16	121
Abbildung A4: Elutionsprofil bei Aufreinigung des Reaktionsansatzes zur Darstellung von 13 mittels Größenausschlusschromatographie (PD-10-Säule).....	122
Abbildung A5: MALDI-TOF-Massenspektrum für das Immunogen 16 und ungekoppelte Rinderserumalbumin.....	122
Abbildung A6: Massenspektrum (A-C) für den Fall 2 aus Abbildung 36 bei Vermessung der für SMX erhaltenen Neutralverluste. Gezeigt ist vergrößert das Signal bei einem m/z -Verhältnis von 296 für N^4 -Acetyl-SMX. (D-F) Massenspektrum für den Fall 1 aus Abbildung 36 bei Vermessung des Quasi-Moleküliions der für SMX erhaltenen Fragmente. Gezeigt ist vergrößert das Signal bei einem m/z -Verhältnis von 250 für Sulfapyridin.....	123
Abbildung A7: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,9 min erhaltenes Massenspektrum für 1 bei Verwendung der HPLC-Methode 1.....	124
Abbildung A8: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,6 min erhaltenes Massenspektrum für 2 bei Verwendung der HPLC-Methode 1.....	124
Abbildung A9: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,6 min erhaltenes Massenspektrum für 3 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	124
Abbildung A10: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 12,1 min erhaltenes Massenspektrum für 4 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	125
Abbildung A11: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,4 min erhaltenes Massenspektrum für 5 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	125
Abbildung A12: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,2 min erhaltenes Massenspektrum für 6 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	125
Abbildung A13: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,2 min erhaltenes Massenspektrum für 7 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	126

Abbildung A14: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 11,8 min erhaltenes Massenspektrum für 8 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	126
Abbildung A15: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 14,3 min erhaltenes Massenspektrum für 9 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	126
Abbildung A16: (D) UV-Chromatogramm und (A, B und C) erhaltene Signale für die erwarteten MRM-Übergänge für 10 bei Verwendung der HPLC-Methode 5.....	127
Abbildung A17: ^1H -NMR-Spektrum (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten) für 10	128
Abbildung A18: Zuordnung der Signale aus dem ^1H -NMR-Spektrum zu den entsprechenden Protonen (oben) und aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen (unten) für 10	129

1. Einleitung und Zielsetzung

Im ersten Abschnitt der Arbeit wird in die analytische Methode Immunoassays und die bei seiner Anwendung in der Umweltanalytik häufig auftretende Problematik der Matrixeffekte und des Auftretens von kreuzreagierenden Stoffen (Kreuzreaktanden) eingeführt. Wie bei fast alle analytischen Methoden kann auch beim Einsatz von Immunoassays die Quali- und Quantifizierung durch Interferenzen beeinflusst werden. Die Schwierigkeit, beim Immunoassay besteht darin, diese Störung zu erkennen. Deshalb stehen viele Anwender Immunoassays mit einer gewissen Skepsis gegenüber. Aufgabenstellung dieser Arbeit war es, neue methodische Ansätze zu erarbeiten, durch welche Interferenzen erkannt und gegebenenfalls reduziert werden können.

1.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Viele immunanalytische Verfahren werden als Quantifizierungsmethode verwendet und zeigen häufig eine gute Richtigkeit. Es ist bemerkenswert, dass durch Verwendung von ausschließlich Antikörpern Probenbestandteile nach ihrer elektronischen Struktur beziehungsweise Fähigkeit zur Ausbildung spezifischer Wechselwirkungen diskriminiert werden können. Dies bietet einen orthogonalen Ansatz zu vielen anderen analytischen Messverfahren, welche andere Stoffeigenschaften nutzen. Schon 1907 führte Arrhenius unter Ausnutzung der Bindungseigenschaften von Antikörpern erste quantitative immunchemische Analysen durch [1]. Die Anwendbarkeit als Routinemethode wurde möglich, nachdem Yalow und Berson im Jahre 1959 den Radioimmunoassay entwickelten [2]. Yalow erhielt dafür 1977 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Ein Nachteil der Radioimmunoassays war jedoch die Verwendung von radioaktiven Stoffen. Eine Alternative ergab sich durch Verwendung von Enzymlabels, welche ebenfalls zur Signalerzeugung dienen können [3,4]. Die Verwendung von Enzymen ermöglicht eine weiterhin empfindliche Detektion bei einfacherem und ungefährlicherem Umgang. Das am weitesten verbreitete immunanalytische Verfahren unter Verwendung von Enzymlabeln ist der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). Der ELISA kommt besonders in der klinischen Diagnostik zum Einsatz [5-7]. Neben dem ELISA gibt es noch eine Vielzahl anderer Immunoassays und Immunosensoren, welche sich vorrangig in ihrer Art der Signaldetektion, Art der Plattform wie Mikrotiterplatten oder Objektträger und Art der auf der Oberfläche immobilisierten Bestandteile wie Antikörper oder Antigen unterscheiden [8-10]. Hier soll nur detailliert auf den direkten kompetitiven ELISA eingegangen werden, weil ausschließlich dieser in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kam. Der schematische Ablauf ist in Abbildung 1 dargestellt.

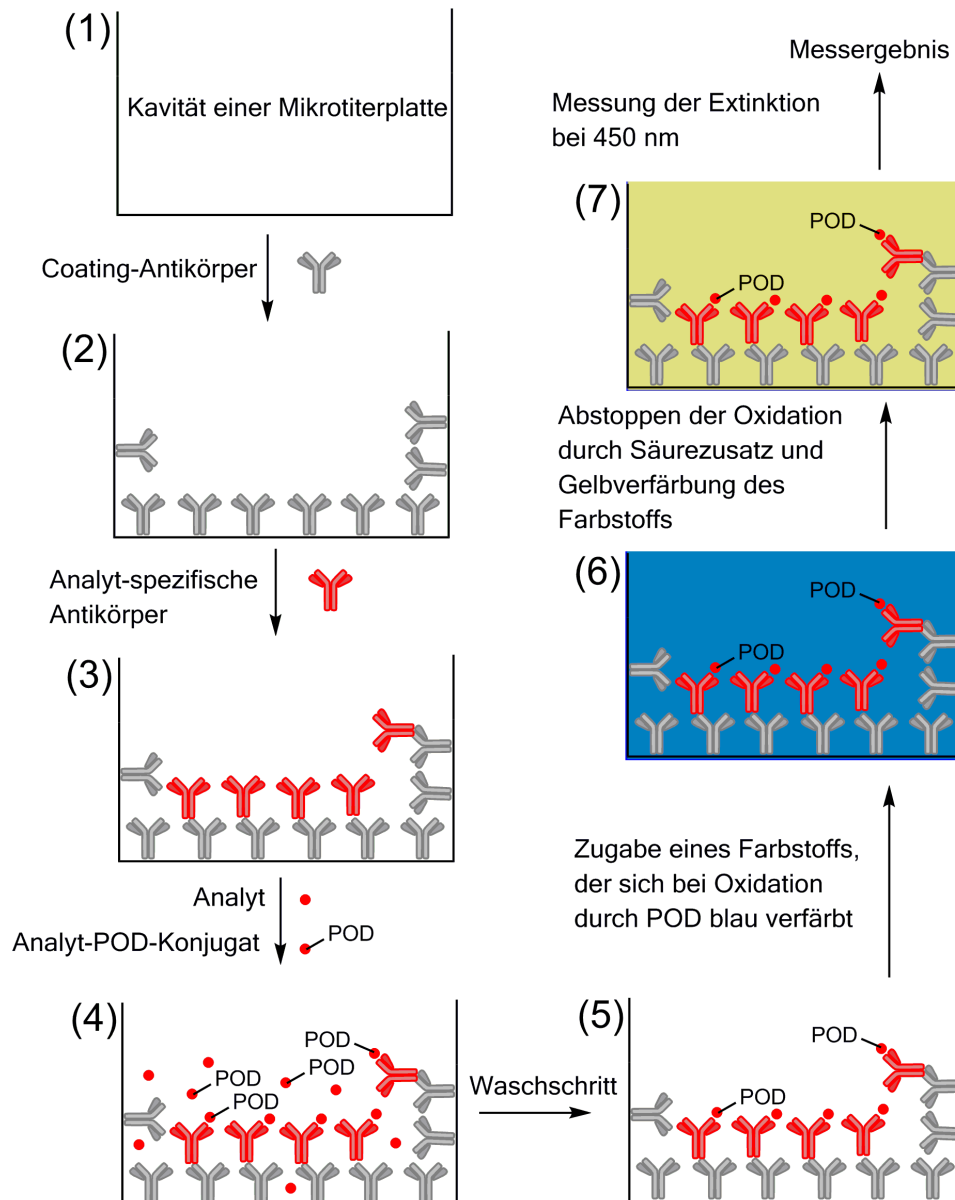


Abbildung 1: Schematischer Ablauf eines direkten kompetitiven ELISAs.

Dabei wird eine Mikrotiterplatte mit typischerweise 96 Kavitäten verwendet, welche eine hohe Bindungsaffinität gegenüber Antikörpern besitzt. In die Kavitäten wird ein sogenannter Coating-Antikörper, gelöst in Puffer, gegeben. Dieser Coating-Antikörper ist ein Antikörper, welcher gegen den später hinzugegeben Analyt-spezifischen Antikörper gerichtet ist. Wird als Analyt-spezifischer Antikörper beispielsweise ein Antikörper verwendet, welcher aus einem Kaninchen gewonnen wurde, so wird als Coating-Antikörper ein anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Zur Bindung des Coating-Antikörpers an der Oberfläche der Kavität (2) wird eine Inkubationszeit von typischerweise 18 h verwendet. Anschließend werden die Kavitäten geleert und gewaschen, um alle nicht gebundenen Coating-Antikörper zu entfernen. Im nächsten Schritt (3) wird nun der Analyt-spezifische Antikörper in die Kavitäten gegeben, um dort an die gegen ihn gerichteten Coating-Antikörper zu

binden. Für diesen Schritt wird typischerweise eine Zeit von 30-60 min veranschlagt. Im Anschluss werden die Kavitäten geleert und gewaschen, um alle nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Bei dem nächsten Schritt, Schritt (4), handelt es sich um den wichtigsten Schritt, der zur Richtigkeit der Ergebnisse beiträgt. In diesem Schritt wird die Probe bzw. ein Kalibrierstandard aufgegeben sowie der Tracer. Bei dem Tracer handelt es sich um ein Konjugat, welches dem Analyten idealerweise in der Struktur genau gleicht und zusätzlich eine signalgebende Untereinheit besitzt. Diese messbare Einheit ist bei den in dieser Arbeit verwendeten ELISAs ein Enzym, eine Peroxidase (POD) aus Meerrettich. Die POD ist dabei an ein sogenanntes Hapten gekoppelt. Bei dem Hapten kann es sich um den Analyten handeln, sofern dieser eine funktionelle Gruppe zur Kopplung besitzt. Falls dies nicht der Fall ist, muss das Hapten durch Derivatisierung des Analyten synthetisiert werden. Im Schritt (4) kommt es zu einer Gleichgewichtseinstellung von an die Bindungsstellen des Analyt-spezifischen Antikörpers gebundenen Analyt- und Tracer-Molekülen. Für diesen kompetitiven Schritt wird typischerweise eine Inkubationszeit von 30 min gewählt. Nach dieser Zeit wird die Platte erneut geleert und gewaschen (5). Anschließend wird eine Substratlösung in die Kavitäten gefüllt. Bei dem Substrat handelt es sich um den zunächst farblosen Farbstoff 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), gelöst in einem Puffer mit pH = 4 und einem geringen Anteil an Wasserstoffperoxid. Durch die an den Antikörpern gebundene Peroxidase wird TMB oxidiert und die Lösung verfärbt sich blau (6). Die Peroxidase wirkt dabei katalytisch und kann eine große Anzahl an TMB-Molekülen oxidieren. Diese katalytische Aktivität ermöglicht es erst, die geringen Mengen an gebundener POD mit einer relativ unempfindlichen Analysenmethode wie der Photometrie zu messen und so eine empfindliche Messmethode zu erhalten. Nach typischerweise 30 min wird die Oxidationsreaktion durch Inaktivierung der POD mittels verdünnter Schwefelsäure gestoppt. Durch den sauren pH-Wert wird das blaue TMB gelblich (7). Anschließend wird die Extinktion bei 450 nm gemessen und häufig um die Extinktion bei 620 nm als Referenzwellenlänge vermindert.

Bei Anwendung des direkten ELISAs wird als Kalibrierfunktion ein sigmoidaler Verlauf erhalten wie er in Abbildung 2 dargestellt ist. Der sigmoidale Verlauf wird jedoch lediglich erhalten bei einer linearen Auftragung der Extinktionswerte gegen den dekadischen Logarithmus der Analytkonzentration. Man beachte, dass man einen inversen Signalverlauf erhält. Niedrige Analytkonzentrationen führen zu hohen Signalintensitäten, da bei geringen Analytmengen die Menge an gebundenen Tracer maximal wird. Hohe Analytkonzentrationen führen zur Verdrängung des Tracers von den Antikörperbindungsstellen und dadurch zu niedrigen Signalintensitäten. Der für eine Quantifizierung nutzbare Konzentrationsbereich ist der Bereich bei dem Tracer und Analyt zu signifikanten Anteilen gebunden sind.

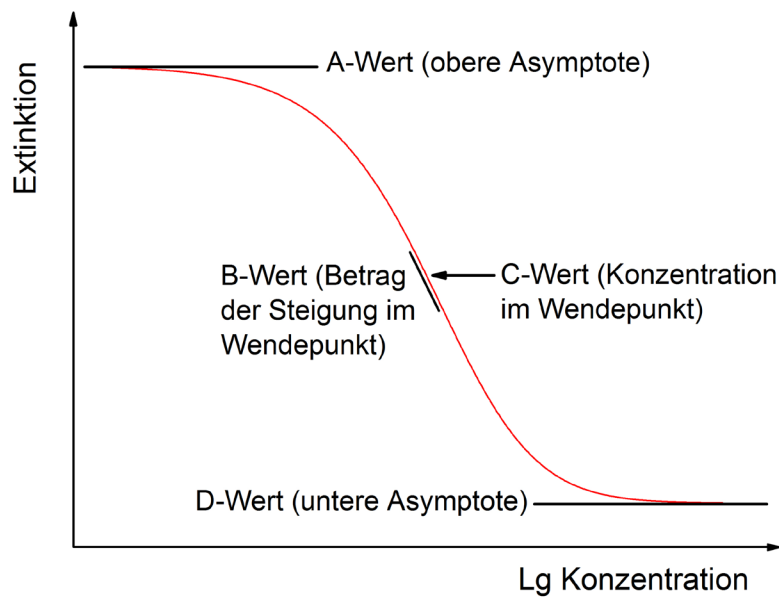


Abbildung 2: *Simulierter Verlauf einer Kalibrierfunktion eines direkten ELISAs mit Erklärung der Parameter A, B, C und D aus der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard.*

Die sigmoidale Anpassungsfunktion gelingt bei Verwendung der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard (Gleichung 1) [11]. Dabei repräsentiert y die gemessenen Extinktionswerte und x die Analytkonzentration. Die Variablen A, B, C und D sind in Abbildung 2 beschrieben.

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D \quad (\text{Gleichung 1})$$

Zum Aufbau eines ELISAs sind die verwendeten Antikörper von entscheidender Bedeutung. Allgemein gibt es zwei wesentliche Arten von Antikörpern, welche beide innerhalb dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Es wird unterschieden in polyklonale und monoklonale Antikörper. Für die Produktion beider Antikörperklassen wird einem Lebewesen ein sogenanntes Immunogen injiziert. Dieses Immunogen löst eine Immunantwort aus, was typischerweise nur für artfremde Stoffe mit einer Molekülmasse von mehr als 1000 Dalton gelingt [12]. Möchte man eine Antikörperproduktion gegen Substanzen mit einer geringeren Molmasse, wie etwa Pharmazeutika, auslösen, müssen diese an makromolekulare Carrier wie Proteine (Trägerprotein) gekoppelt werden. Bei Gebrauch von polyklonalen Antikörpern werden das Blutserum des Tieres und die darin enthaltene Antikörpermischung verwendet. Um eine ausreichend große Menge an Serum zu erhalten, werden für polyklonale Antikörper häufig größere Tiere wie Kaninchen oder Ziegen immunisiert.

Für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern werden meist Mäuse immunisiert. Anschließend wird nicht das Blutserum verwendet, sondern die B-Lymphozyten aus der Milz entnommen und mit Zellen aus einem Myelom fusioniert. Die dabei gebildeten Hybridomazellen besitzen die Eigenschaft der Antikörperproduktion aufgrund der B-Lymphozyten und neigen aufgrund der Myelomzellen zur unbegrenzten Zellteilung. Es können daher bei Zellkultivierung der Hybridomazellen theoretisch unendlich lange Antikörper aus dem Zellkulturüberstand gewonnen werden. Die Zellfusion zur Bildung von Hybridomazellen, die sogenannte Hybridom-Technik, wurde 1975 von César Milstein und Georges Köhler entwickelt [13]. Die beiden erhielten dafür 1984 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Nach der Fusion werden die erhaltenen Hybridomazellen so stark verdünnt, dass man bei Auftragung eines kleinen Volumens in die Kavität einer Mikrotiterplatte theoretisch pro Kavität nur eine Zelle einträgt (ausplattieren). Danach muss diejenige Hybridomazelle ermittelt werden, welche die gewünschten Antikörper produziert. Da eine Hybridomazelle auf nur einer B-Lymphozyten-Zelle basiert, wird sie auch nur eine Spezies von Antikörpern produzieren.

Unabhängig davon, welche Antikörper verwendet werden bieten ELISAs sich vor allem als Screening- und Monitoring-Methoden an. Aufgrund ihres miniaturisierten Formates und ihrer Plattform (Mikrotiterplatten) können viele Proben parallel vermessen werden. Dies erlaubt einen, im Vergleich zu anderen Messmethoden, hohen Probendurchsatz in kurzer Zeit. In der Vergangenheit lieferten Immunoassays für manche Stoffe teilweise unerreichte Nachweisempfindlichkeiten, was sich aber mit der stark voranschreitenden Entwicklung im Bereich der Massenspektrometrie relativiert. Auch der Vorteil des hohen Probenumsatzes rückt mit Voranschreiten der Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC), welche auch kurze Analysenzeiten ermöglicht, zunehmend in den Hintergrund. Ein Nachteil des ELISAs, der aber dessen Grundlage ist, ist die hohe Selektivität der Antikörper. Ein ELISA kann bei Verwendung eines Antikörpers prinzipiell nur einen Stoff nachweisen. Lediglich bei Verwendung verschiedener Antikörper und Detektionseinheiten ist er als Multianalytmethode anwendbar. Zudem muss aufgrund der Immunogensynthese, Immunisierung und Optimierung des ELISAs mit einer vergleichsweise langen Methodenentwicklungszeit von typischerweise einem Jahr bis hin zu Jahren gerechnet werden. Der apparative Aufwand der für die Durchführung eines ELISAs notwendig ist, ist jedoch sehr gering. Daher kann der ELISA im Prinzip als Feldmethode eingesetzt werden. Zudem ist er eine relativ kostengünstige Methode, welche auch von weniger geschultem Personal durchgeführt werden kann [14].

1.2 Interferenzen bei Verwendung des ELISAs und deren Gründe

Unabhängig vom hohen Probenumsatz bei guter Nachweisempfindlichkeit und geringen Kosten, sollte der ELISA eine ausreichend gute Richtigkeit aufweisen. Dies ist häufig nicht der Fall. Der Grund dafür liegt meist in einer unzureichenden Selektivität der Antikörper oder ist eine mehr oder weniger zufällige Störung. Ein eher selten auftretender Effekt, welcher aufgrund von zu hohen Analytkonzentrationen zur untypischen Unterbestimmung führt, ist der Hook- oder Prozone-Effekt [15]. Eine andere Ursache für falsche Ergebnisse könnte durch die Inhibierung oder Aktivierung der Detektionseinheit, wie etwa dem Enzym, auftreten [8]. Aber auch die Konzentration an Ionen wie Na^+ , Mg^{2+} , Al^{3+} , K^+ , Ca^{2+} , Pb^{2+} und Cd^{2+} beziehungsweise allgemein die Ionenstärke der Probenlösung kann die Quantifizierung beeinflussen [16]. Der pH-Wert der Probenlösung oder Anteile an organischen Lösungsmitteln können ebenfalls den Antikörper schädigen oder die Wechselwirkung von Antikörper und Antigen beeinflussen [17,18].

Als ein weiteres Beispiel für eine unspezifische Interferenz wird häufig die Klasse der Huminsäuren genannt und deren Einfluss auf die Quantifizierung gezeigt [19]. Dabei kann es zu sehr großen Überbestimmungen von bis zu mehr als 1000 % bei Dotierung mit realistischen Konzentrationen an Huminsäure von 20 mg/L kommen [20].

Eine Überbestimmung von Konzentrationen bei Quantifizierung mittels Immunoassay im Vergleich zu einer Referenzmethode ist ein häufig beschriebenes Phänomen. Dabei wurden Überbestimmungen von bis zu 700 % publiziert [21-25]. Interessant ist, dass teilweise deutlich unterschiedliche Überbestimmungen für anscheinend sehr ähnliche Matrices erhalten werden. Steimer (1999) quantifizierte Cyclosporin A in Blutproben mittels verschiedener Immunoassays und einer HPLC-Methode als Referenzmethode. Dabei erhielt er eine mittlere Überbestimmungen bei Verwendung der Immunoassays von 9-57 %. Für einzelne Patienten lag diese aber bei über 200 % [26].

Unspezifische Interferenzen sind schwer vorhersehbar und erklärbar, weshalb in vielen Publikationen versucht wird die Überbestimmung mit sogenannten Kreuzreaktanden zu erklären. Kreuzreaktanden sind Stoffe, welche in ihrer elektronischen Struktur dem Analyten ähneln und daher auch an den Antikörper binden können. Dies erscheint als Erklärung für Überbestimmungen plausibel und ermöglicht es gezielt einzelne Stoffe auf deren Interferenzpotenzial (Kreuzreaktivität) zu untersuchen sowie diese in der Probe nachzuweisen. Die Kreuzreaktivität wird dabei durch Vergleich der Kalibrierfunktionen von dem zu untersuchenden Stoff und dem Zielanalyten erhalten (Abbildung 3).

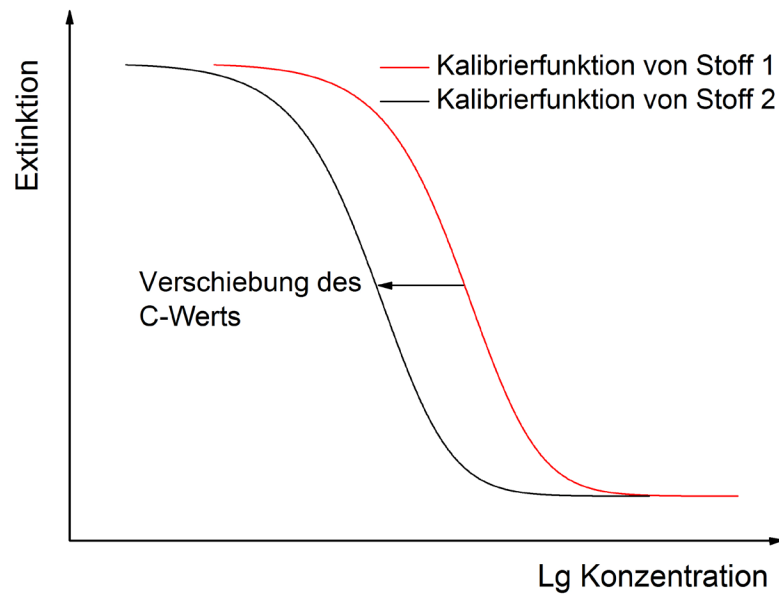


Abbildung 3: *Simulierter Verlauf der Kalibrierfunktionen zweier Stoffe bei Anpassung mit der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard.*

Für die Berechnung der Kreuzreaktivität wird die Verschiebung des C-Werts herangezogen [27], welcher ein Maß für die Nachweissensitivität des ELISAs ist. Häufig wird der C-Wert auch als IC_{50} angegeben, was der Konzentration bei 50 % Inhibierung des Signals entspricht. In Gleichung 2 ist die Berechnung der Kreuzreaktivität für einen Stoff x (Kreuzreaktand) angegeben.

$$\text{Kreuzreaktivität} = \frac{\text{C-Wert (Zielanalyt)}}{\text{C-Wert (Kreuzreaktand)}} \cdot 100 \% \quad (\text{Gleichung 2})$$

Ist der C-Wert für einen Kreuzreaktanden zu niedrigeren Konzentrationen verschoben, besitzt er eine Kreuzreaktivität von $> 100 \%$. Bei einer Verschiebung des C-Werts zu höheren Konzentrationen liegt die Kreuzreaktivität bei unter 100% . Da bei diesem Ansatz die Konzentration verwendet wird, kann die Kreuzreaktivität eines Stoffes mit einer vom Analyten deutlich verschiedenen Molmasse, zu einem falschen Eindruck der Bindungsaffinität führen. Häufig wird daher noch die Molmasse berücksichtigt, so dass nicht mehr die Konzentrationen sondern die Molaritäten beim C-Wert ins Verhältnis gesetzt werden.

1.3 Möglichkeiten zur Reduktion von Interferenzen

In der Vergangenheit wurden in der Literatur verschiedene Ansätze zur Reduktion des bekannten Problems der Interferenz, welche hauptsächlich zur Überbestimmung führt, vorgeschlagen. Dabei sollte stets berücksichtigt werden, dass der ELISA typischerweise als Screening-Methode mit hohem Probendurchsatz dienen soll. Eine aufwendige Probenaufbereitung ist mit dem hohen Probendurchsatz nicht kompatibel. Trotzdem kann eine komplexe Aufbereitung unter Verwendung verschiedener Festphasenextraktionen oder eine multidimensionale chromatographische Aufreinigung der Probe zielführend sein [28].

Als einfachster Ansatz der Probenbehandlung kann die Verdünnung der Probe dienen, welche besonders zur Reduktion von unspezifischen Interferenzen hilfreich sein kann. In der Literatur wird eine Probenverdünnung von bis zu einem Faktor 1000 vorgeschlagen, die jedoch eine ausreichend gute Nachweisempfindlichkeit des ELISAs voraussetzt [29-31].

Für die Reduktion einer Interferenz durch Huminsäuren wird die Anwendung von 1 % Rinderserumalbumin (BSA) als Probenzusatz vorgeschlagen. Dadurch konnten Überbestimmungen von über 1000 %, die bei der Vermessung von Standards auftraten, auf etwa 100 % abgesenkt werden [20,32]. Beim Vergleich der ermittelten Koffeinkonzentrationen in Wasserproben ergab sich jedoch trotz eines Zusatzes von BSA eine systematische Überbestimmung bei Verwendung des ELISAs im Vergleich zum quantifizierten Gehalt mittels LC-MS/MS.

Eine gezielte Methode zur Reduktion von Kreuzreaktanden, welche häufig Metaboliten des Zielanalyten sind, ist die Anwendung der Hydrolyse [33,34]. Dabei lieferten die enzymatische Hydrolyse mittels einer Mischung aus β -Glucuronidase und Arylsulfatase sowie die saure Hydrolyse Erfolge bei der Absenkung der Überbestimmung. Die Wiederfindung betrug vor der Behandlung bis zu 300 % und konnte auf durchschnittlich rund 110 % abgesenkt werden.

Eine andere Möglichkeit um eine Interferenz durch Kreuzreaktanden zu unterdrücken ist die Vermessung der Probe bei unterschiedlichen pH-Werten. In besonderen Fällen unterscheidet sich der Kreuzreaktand vom Analyten so stark, dass dies zu einer Minderung der Störung führen kann, wie in einer Arbeit von Bahlmann et al. (2011) gezeigt wurde. Dabei wurde ein Carbamazepin-ELISA verwendet, wobei das Antihistaminikum Cetirizin bei pH 4,5 eine Kreuzreaktivität von über 400 % und bei pH 10,5 nur eine Kreuzreaktivität von etwa 22 % zeigte [35].

Ein anderer Ansatz verfolgt die Anwendung einer Matrixkalibrierung um eventuelle Matrixeffekte auszugleichen [36]. Die Herausforderung bei dieser Idee liegt darin,

dass sehr häufig die analytfreie Matrix nicht vorliegt. Eine Simulation der Matrix ausgehend von Reinstwasser und Dotierung mit Stoffen wird die Matrix nicht adäquat darstellen, da der ELISA von diversen Stoffen mit Konzentrationen im Spurenbereich, wie für die Kreuzreaktanden, gestört werden kann. Die Charakterisierung und Nachahmung der Probe in deren Salzkonzentrationen, Anteil an organischen Verbindungen und Kreuzreaktanden ist lediglich theoretisch möglich. Zudem zeigte diese und andere in der Literatur beschriebene Arbeiten, dass sich die Höhe der Überbestimmung für ähnliche Matrices deutlich unterscheiden kann. Ein bei anderen Messmethoden häufig eingesetztes Verfahren zur Minimierung von Quantifizierungsfehlern, hervorgerufen durch Matrixeffekte, ist die Standardaddition des Analyten. Diese versagt jedoch bei Immunoassays häufig, weil Interferenzen sich nicht proportional zur gemessenen Konzentration des Zielanalyten auswirken. Die Interferenz der unspezifischen Bindung oder Bindung durch Kreuzreaktanden liefert eine Art Untergrundsignal, welches sich durch die Standardaddition nicht identifizieren und bestimmen lässt.

Ein anderer erfolgversprechender Ansatz beruht auf einem Wechsel des Tracers. Es ist allgemein in zwei verschiedene Typen von Tracern zu unterscheiden. Ein Typ ist der homologe Tracer. Dabei wird für die Synthese des Tracers das gleiche Hapten eingesetzt, welches für die Immunogensynthese verwendet wurde. Dies stellt häufig sicher, dass der Tracer eine gute Bindungsaffinität zum Antikörper zeigt und es ist keine zusätzliche Entwicklung und Synthese eines neuen Haptens notwendig. Ein Nachteil des homologen Tracers kann eine schlechte Nachweisempfindlichkeit des ELISAs sein, wenn der Tracer eine sehr hohe Bindungsaffinität für den Antikörper aufweist. In diesem Fall sind sehr hohe Konzentrationen an Analyt notwendig, um den Tracer von der Bindungsstelle des Antikörpers zu verdrängen und eine Signalveränderung zu erreichen. Ein anderes Problem, welches besonders bei einem Hapten mit einer langen Brücke (spacer) zwischen Analyt und Protein auftreten kann, ist die sogenannte Brücken-Erkennung (bridge oder spacer recognition). Dabei bindet der Antikörper den Tracer nicht aufgrund seiner Zielanalyt-Struktur, sondern aufgrund einer starken Wechselwirkung mit der Brückeneinheit. Abhilfe kann dabei ein heterologer Tracer schaffen [37]. Bei einem heterologen Tracer wird für die Tracersynthese ein anderes Hapten als für die Immunogensynthese verwendet. Häufig wird dabei nur die Länge der Brückeneinheit verändert. Eine Veränderung der Substitutionsposition am Analyten hat jedoch den größten Einfluss auf die Bindungseigenschaften [38,39]. Assays sind bei Verwendung eines heterologen Tracers meist empfindlicher, da dieser schwächer an die Antikörper bindet und daher leichter von schon geringeren Analytkonzentrationen verdrängt werden kann [40-44]. Es gibt jedoch auch Gegenbeispiele [45,46]. Zudem ist es wichtig, dass der heterologe Tracer noch eine ausreichend gute

Bindungsaffinität zum Antikörper zeigt, um ein Signal zu erhalten [38,37]. Da es im Probenauftragungsschritt (Abbildung 1, Schritt (4)) zu einer Gleichgewichtseinstellung von gebundenen Tracer und Probeninhaltsstoff kommt, kann durch Veränderung des Tracers, neben der Empfindlichkeit des Assays auch die Selektivität verändert werden. Dies ist besonders leicht bei polyklonalen Antikörpern vorstellbar. Durch Änderung der Haptenstruktur bindet der Tracer an andere Antikörper, welche eine andere Selektivität besitzen. In der Literatur beschriebene Ergebnisse zeigen durch Einsatz eines heterologen Tracers teilweise leicht erhöhte [43] und andere deutlich gesenkte Kreuzreaktivitäten [47]. Allgemein zeigt sich, dass die Kreuzreaktivitäten von Stoffen durch Anwendung eines heterologen Tracers gesenkt werden können, jedoch zeigen stets die gleichen Stoffe die entsprechend höchste Kreuzreaktivität [48,43,46]. Eine vollständige Eliminierung der Kreuzreaktivität oder Umkehr der Selektivitäten scheint durch Veränderung des Tracers nicht möglich.

1.4 Identifikation von Interferenzen

Ein wesentliches Problem der Interferenzen im ELISA besteht darin, diese als solche zu erkennen. Da beim ELISA die Separation der Probeninhaltsstoffe lediglich auf der Selektivität der Antikörper beruht und man als Ergebnis lediglich einen Extinktionswert erhält, dem man mittels einer Kalibrierfunktion eine Konzentration zuordnet, kann man den ELISA als eine „Black-Box-Methode“ ansehen. Der Anwender erhält kein Signal-zu-Rausch-Verhältnis wie bei anderen Messmethoden. Daher ist es schwer, schnell Interferenzen zu erkennen und führt zur Skepsis vieler Anwender. In der Vergangenheit wurde versucht „Licht in die Black-Box“ zu bringen und die Auftrennung der Probeninhaltsstoffe zu unterstützen. Obwohl dieses Thema von großer Bedeutung ist, gibt es bisher nur sehr wenige Publikationen auf diesem Gebiet. Häufig wird zur Auftrennung der Probe, wie auch in dieser Arbeit, die HPLC eingesetzt. Die in der Literatur beschriebenen Methoden wurden jedoch meist nur für eine qualitative Analyse genutzt. Die Identifikation von kreuzreagierenden Stoffen ist dabei am bedeutsamsten, wie in einer Arbeit von Nielsen et al. (2003) [49]. Häufig fehlen aber nähere Beschreibungen wie die Dauer der Fraktionierungsintervalle. Nielsen et al. sammelten Fraktionen in einer Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten und nutzten diese für eine massenspektrometrischen Vermessung der Fraktionen oder zur Vermessung mittels ELISA. Dabei konnten sie einen unbekannten β -Antagonisten in Futter nachweisen, ohne diesen jedoch eindeutig zu identifizieren.

Lardinios et al. (2008) nutzten die HPLC zur Auftrennung einer Proteinmischung, wobei sie ein Fraktionierungsintervall von 24 s wählten und in Mikroreaktionsgefäße

(Eppendorf tubes) fraktionierten. Anschließend wurden die Fraktionen mittels ELISA vermessen [50].

In einer Arbeit von Song et al. (2009) wurden, zur Klärung einer Überbestimmung von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OH-dG), Urinproben mittels Umkehrphasen-HPLC in 27 Fraktionen mit einem Fraktionierungsintervall von 90 s gesammelt. Die Fraktionen wurden getrocknet und in 0,3 mL einer 3 %igen Methanollösung aufgenommen. Dies entspricht einer Anreicherung um den Faktor 10 im Vergleich zum Injektionsvolumen von 3 mL. Lediglich 3 Fraktionen zeigten ein positives Signal, wobei die Signalintensität in ng/mL 8-OH-dG angegeben wurde. Zur Aufklärung der Interferenz wurden die Retentionszeiten von 6 bekannten Urinhaltsstoffen vermessen, wobei die Retentionszeit von Harnstoff und Allantoin mit der einer positiven Fraktion übereinstimmte. Allantoin zeigte keine und Harnstoff nur eine sehr geringe Kreuzreaktivität. Harnstoff wurde aber aufgrund der hohen Konzentrationen im Urin als teilweise für die Überbestimmung verantwortliche Substanz erklärt [51].

Hradecká et al. (2007) stellte eine Methode vor, bei der über Immunaффinitätssäulen aufgereinigte Proben zur Messung von Abscisinsäure (ABA) mittels LC-ELISA vermessen wurden [52]. Dabei nutzte er ein Fraktionierungsintervall von 30 s. Die Fraktionen wurden ebenfalls getrocknet und der Rückstand in 400 µL Pufferlösung aufgenommen. Zur Quantifizierung wurde [³H](±)ABA zugesetzt und mittels Szintillationszähler die β-Strahlung gemessen. Es wurde die methylierte Form des ABA als ein Kreuzreaktant identifiziert, wobei der Gehalt in der Fraktion als ABA-Äquivalente angegeben wurde. Die Quantifizierung erfolgte aufwendig durch Bestimmung von Signal-zu-Äquivalent-Konzentrations-Verhältnissen, bei Messungen von ELISA-Messreihen mit Verdünnungen und Standardisierungen [53-55].

In einer Arbeit von Zhou et al. (2011) die ebenfalls den LC-ELISA nutzten, wurde auf eine aufwendige Bestimmung von Konzentrationen verzichtet und lediglich die Signalintensität angegeben [56].

Bahlmann et al. (2011) verwendeten ein Fraktionierungsintervall von 30 s und gaben die Signalintensitäten als C_{ELISA} in % an. Eine detaillierte Beschreibung wie die Konzentrationen bestimmt wurden unterblieb jedoch [35].

1.5 Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und ELISA (LC-ELISA)

Anders als bei vielen bisher genannten Arbeiten wurden die Fraktionen in dieser Arbeit in einer Mikrotiterplatte aufgefangen (Abbildung 4).

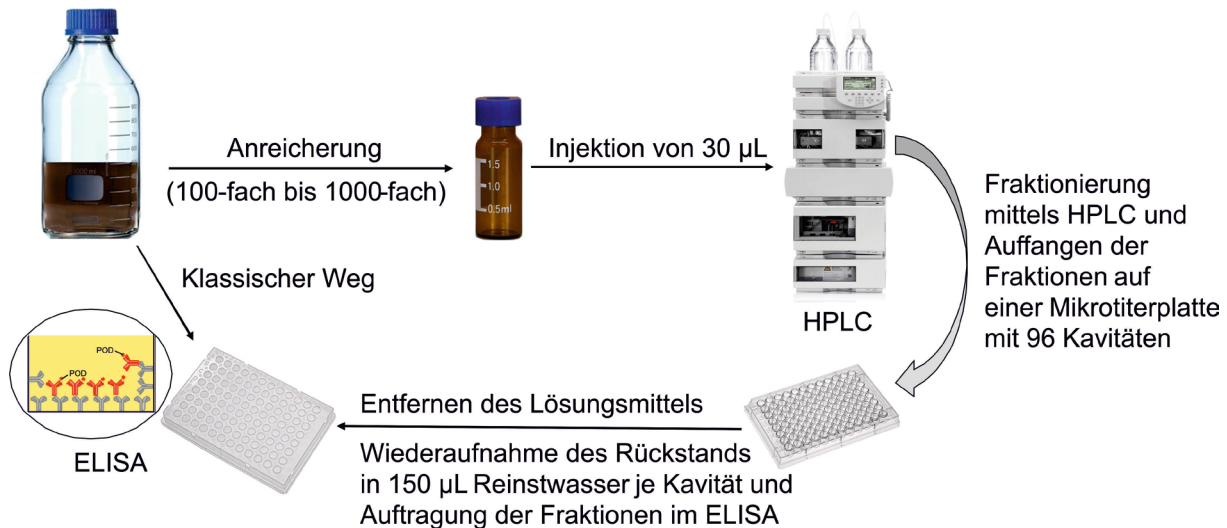


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des LC-ELISAs.

Zunächst wurde die Probe angereichert. Dies ist notwendig, weil die Probe durch die Fraktionierung um mindestens den Faktor 5 verdünnt wird. Es wurden 30 µL Probe injiziert und der Rückstand einer Fraktion später in 150 µL Reinstwasser aufgenommen. Die Elution eines Stoffes kann auch an der zeitlichen Grenze zweier Fraktionen erfolgen, wobei sich der Stoff dann auf zwei Fraktionen verteilt, was zu einer weiteren Verdünnung führt. Bei den untersuchten Analyten handelt es sich um Verbindungen, die typischerweise in den Umweltproben mit einer Konzentration im ng/L-Bereich auftreten. Die erwarteten Konzentrationen lagen daher im Quantifizierungsbereich der entsprechenden ELISAs. Eine Verdünnung, im Rahmen der LC-Separation, um den Faktor 10, führt jedoch zu Konzentrationen, welche mittels der entsprechenden ELISAs nicht mehr quantifizierbar sind. Die Trennung der Probeninhaltsstoffe erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC. Nachdem das Eluat die Säule verlassen und einen UV-Detektor passiert hat, wurde es mittels Fraktionssammler in eine Mikrotiterplatte getropft. Das gesamte System war direkt mit einander gekoppelt. Anschließend wurde das Eluat im Druckluft- oder Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Dies war notwendig, um den störenden Einfluss durch das organische Lösungsmittel, welches für die LC-Separation verwendet wurde, zu entfernen. Dieser Schritt ist kaum vermeidbar, wenn bei der LC-Separation ein Gradient von Lösungsmitteln verwendet wird und sich so der Anteil an organischem Lösungsmittel je nach Fraktion unterscheidet. Zudem führen hohe Anteile an organischen Lösungsmitteln zur Denaturierung der Antikörper und Inaktivierung der Peroxidase des Tracers. Dies ist auch ein Grund weshalb eine

direkte Fraktionierung auf eine antikörperbeschichtete ELISA-Mikrotiterplatte, bei Anwendung von organischen Lösungsmittel als Eluent, nicht möglich ist. Die wieder in 150 µL Reinstwasser aufgenommenen Rückstände wurden auf eine mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte als Probe (100 µL je Kavität) aufgetragen (Abbildung 1, Schritt (4)). Eine Probe wurde durch die LC-Separation in 70 Fraktionen aufgetrennt. Dies führte zu einer 70-fach erhöhten Probenanzahl, welche jedoch durch den hohen Probendurchsatz beim ELISA kein größeres Problem darstellt. Der zeitlimitierende Faktor des LC-ELISAs war das Entfernen des Lösungsmittels, welches etwa 2-3 h dauerte. Um 10 Fraktionierungsplatten zu vermessen, wurden etwa 4 Tage benötigt, wobei 3 Tage für das Entfernen des Lösungsmittels notwendig waren.

Die Kopplung von LC und Immunoassay hat eine gewisse Bedeutung wie man an deren Beschreibung in der Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission [57] betreffend der Durchführung von Analysemethoden und der Auswertung von Ergebnissen erkennt. In dieser Richtlinie wird auch auf LC-Immunogramme eingegangen. Die wesentlichsten Fakten betreffend LC-Immunogramme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: *In der Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission hinsichtlich LC-Immunogramme festgelegte Kriterien*

Auswertungsart	Kriterium	Identifizierungspunkt
LC-Immunogramm	<ul style="list-style-type: none"> - Muss aus 5 Fraktionen bestehen - Jede Fraktion muss kleiner als die Hälfte der Peakbreite sein - Die Fraktion mit dem höchsten Gehalt des Analyten muss für die Testprobe, die positive Kontrollprobe und den Standard die gleiche sein 	1
LC-Immunogramm + X	- Nur, wenn mindestens zwei verschiedene Chromatographiesysteme oder eine zweite unabhängige Nachweismethode verwendet werden	2

Zusätzlich müssen die einschlägigen Kriterien für LC-Methoden erfüllt sein und vorgegebene Qualitätskontrollparameter, z.B. unspezifische Bindung, relative Bindung der Kontrollproben und der Extinktionswert der Leerwertbestimmung, innerhalb der bei der Validierung des Assays ermittelten Grenzwerte liegen. Der LC-ELISA kann als geeignete Bestätigungsmethode dienen, sofern ihm

2 Identifizierungspunkte zugeordnet werden können. Der LC-ELISA allein wird als ungeeignet eingeschätzt. Erst durch Verwendung verschiedener Chromatographiesysteme oder durch Vergleich mit einer Referenzmethode kann der LC-ELISA nach 2002/657/EG zur Bestätigung herangezogen werden.

Bei Anwendung des LC-ELISAs erhält man als Ergebnis keine bloße Zuordnung von einem Extinktionswert zu einer Probe, sondern eine Art Chromatogramm, welches hier als LC-ELISAGramm bezeichnet wird. Beispiele von LC-ELISAGrammen sind in Abbildung 5 dargestellt.

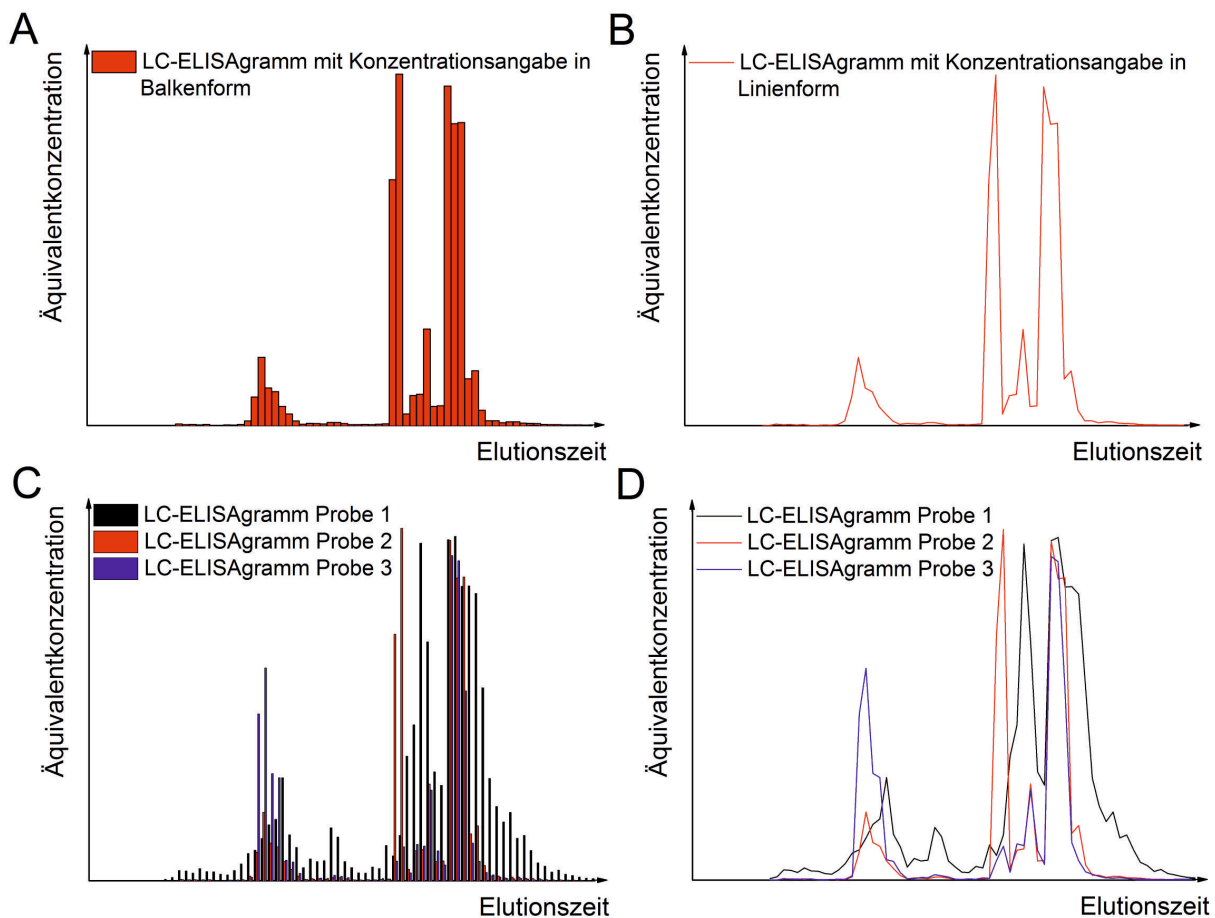


Abbildung 5: LC-ELISAGramm in (A) Balken- und (B) Linienform sowie Überlagerung von LC-ELISAGrammen in (C) Balken- und (D) Linienform.

Ein Balken stellt dabei die gemessene Konzentration in einer Fraktion dar. Als Konzentrationsangabe wird die Analyt-Äquivalentkonzentration angegeben. Der Analyt kann nur von einigen Fraktionen repräsentiert werden. Fraktionen die von dessen Elutionszeit abweichen, können nicht den Analyten und damit auch keine Analytkonzentration wiedergeben. Für diese Fraktionen kann aber eine Äquivalentkonzentration bezogen auf den Zielanalyten angegeben werden. Auf der x-Achse wird die Elutionszeit aufgetragen, welche sich aus der Fraktionsnummer und

dem entsprechenden Fraktionierungsintervall ergibt. Die wissenschaftlich einzig richtige Darstellung ist die Balkenform, da nur Fraktionen und damit der Mittelwert in dem Fraktionierungsintervall als diskreter Wert gemessen werden kann. Die Darstellung als Linienform suggeriert Werte zwischen den Mittelwerten der Fraktionen, was aber nur eine Extrapolation darstellt und nicht durch einen Messwert untermauert ist. Die Linienform bietet aber den Vorteil der Übersichtlichkeit, besonders bei der Überlagerung mehrerer LC-ELISAGramme, wie in Abbildung 5 C und D zu sehen. Die Darstellung in Balkenform führt zu einem schwer durchschaubaren Gemisch von Signalen und aufgrund der Auftragung der Balken nebeneinander auch zu einer fehlerhaften Zuordnung der Elutionszeit.

1.6 Modellanalyten und Modellmatrices

Für die Validierung von Immunoassays im Hinblick auf Kreuzreaktivitäten und Matrixeffekte wurde mit drei ELISAs für verschiedene Modellanalyten gearbeitet. Bei den Analyten handelt es sich um Sulfamethoxazol (SMX), Carbamazepin (CBZ) und Estron (E1), deren Strukturformeln in Abbildung 6 gezeigt sind.

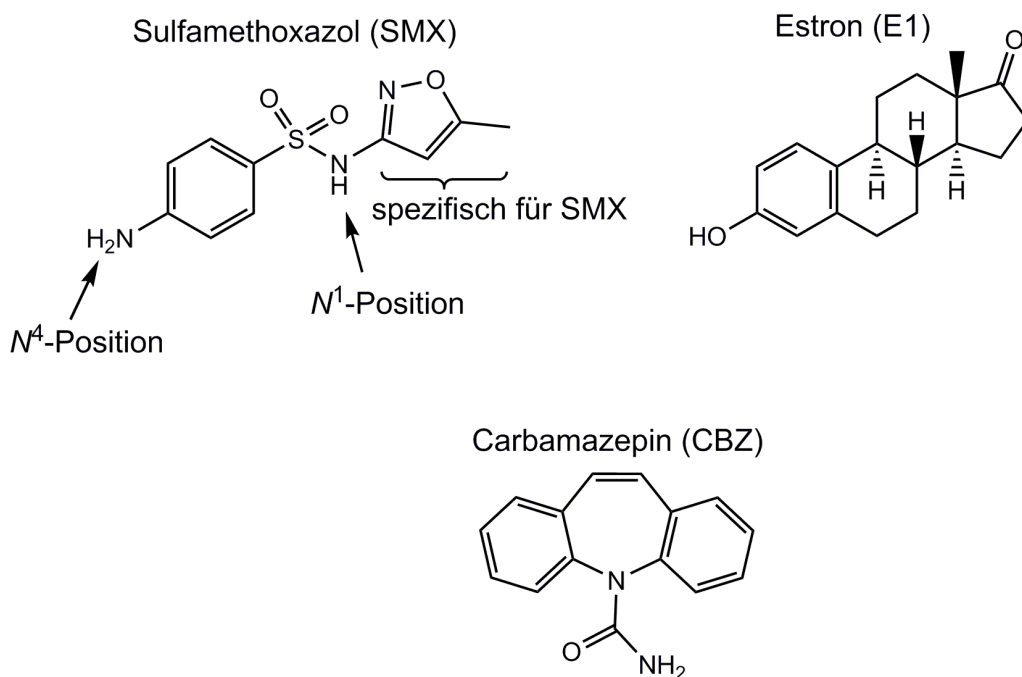


Abbildung 6: Strukturformeln der untersuchten Modellanalyten.

Da die für den ELISA aufwendig gewonnenen Antikörper nur zur Untersuchung eines einzelnen Analyten dienen können, sollten die Analyten eine gewisse Bedeutung haben. Idealerweise sollten die vermessenden Analyten eine ganze Stoffklasse repräsentieren oder als Markersubstanz für bestimmte Einflüsse dienen.

Sulfamethoxazol gehört zur Gruppe der Sulfonamide, welche sich im Wesentlichen nur in einem unterschiedlichen Substituenten an der N^1 -Position unterscheiden. SMX ist ein Antibiotikum, welches in Kombination mit Trimethoprim zur Behandlung von Atem- und Harnwegsinfektionen eingesetzt wird. Die Jahresverbrauchs menge im Jahre 2009 betrug in Deutschland 35 Tonnen, mit einer jährlich abnehmenden Tendenz [58]. Sulfamethoxazol, als häufig angewendetes Antibiotikum, sollte aufgrund des prinzipiellen Potenzials zur Bildung von Antibiotikaresistenzen im Fokus von Monitoring-Projekten stehen. Es kann in Klärwerken nur ungenügend eliminiert werden [59,60] und kann daher mit Konzentrationen im unterem ng/L- bis µg/L-Bereich in Oberflächengewässern nachgewiesen werden [61-64]. SMX konnte im unteren ng/L-Bereich sogar in Grund- und Trinkwasser detektiert werden [65,66]. Hinsichtlich der Gefahr von Interferenzen durch Kreuzreaktanden sollte die Aufmerksamkeit auf Metaboliten des Analyten gerichtet sein. SMX wird im Menschen zu etwa 85 % metabolisiert [67], wobei die Metaboliten N^4 -Acetyl-SMX (Hauptmetabolit mit etwa 80 % [68]), SMX- N^1 -Glucuronid, 5-Methylhydroxy-SMX, N^4 -Acetyl-5-Methylhydroxy-SMX und N^4 -Hydroxy-SMX bekannt sind [68,69]. Aber auch 4-Nitro-SMX und 4-Nitroso-SMX sind als Transformationsprodukte nachweisbar [70].

Bei dem Analyten Carbamazepin handelt es sich um ein Antiepileptikum mit einem Jahresverbrauch, im Jahre 2005 in Deutschland von 64 Tonnen, wovon 59 Tonnen metabolisiert ausgeschieden wurden [71]. Verschiedenste Metaboliten von Carbamazepin, wie verschiedene Hydroxy- und Methyl-Metaboliten, ein Glucuronid-Metabolit und ein Epoxid-Metabolit sind bekannt [72-74]. CBZ wird nur unzureichend im Klärwerk eliminiert. Die Eliminierungsrate kann aber durch Einsatz einer vierten Reinigungsstufe wie durch Verwendung von Pulveraktivkohle auf bis zu 99 % erhöht werden [75]. Es kann daher als Markersubstanz zur Überwachung der Reinigungsleistung eines Klärwerks dienen.

Der dritte Modellanalyt ist das Hormon Estron. Es ist ein Vertreter der natürlichen Estrogene die vom Menschen täglich in Mengen von µg bis mg ausgeschieden werden [76]. Hormone wie Estron können als endokrine Disruptoren wirken. Es wirkt auf das Hormonsystem und kann schon im ng/L-Konzentrationen zur Hermaphroditismus führen, weshalb Estrogene besonders hinsichtlich ihrer hohen potenziellen Ökotoxizität in der aquatischen Umwelt überwacht werden sollten [77]. Aber auch das hormonelle System hinsichtlich Produktion, Transport und Metabolismus von Hormonen kann beeinflusst werden [78]. Estron hat nicht die höchste estrogene Wirkung der Estrogene [79], kann aber typischerweise mit den höchsten Konzentrationen in Oberflächengewässern von wenigen ng/L nachgewiesen werden [80,81] und bietet sich daher als Vertretersubstanz an. In

Klärwerkszuläufen werden Konzentrationen um etwa 100 ng/L Estron gemessen [82,83]. Bekannte Metaboliten des Estrons sind: E1-3-Sulfat [84], E1-3-Glucuronid [85], 2-Hydroxy-E1, 16- α -Hydroxy-E1 und 4-Hydroxy-E1 [86]. Aber auch andere Estrogene wie Estradiol oder Estriol könnten aufgrund ihrer ähnlichen Struktur potenzielle Kreuzreaktanden sein.

Der ELISA wird typischerweise als Methode zur schnellen Vermessung vieler Proben verwendet, weshalb es sich bei den zu vermessenden Matrices häufig um wässrige Proben handelt, die nicht weiter aufbereitet werden müssen. In dieser Arbeit wurden als Modellmatrices unter anderem Oberflächenwasserproben vom Berliner Landwehrkanal und Teltowkanal verwendet. Aber auch anspruchsvollere Matrices wie Abwässer wurden vermessen. Dabei wurden die Klärwerkszuläufe und -abläufe aller 6 Berliner Klärwerke untersucht, um den Einfluss von individuellen Klärwerken auf mögliche Interferenzen hin zu untersuchen. Des Weiteren wurden Abwässer vom Klärwerk Steinhäule aus Neu-Ulm getestet. Dieses Klärwerk betreibt eine vierte Reinigungsstufe. Es wurde mit diesen Proben der Einfluss der Abwasserbehandlung untersucht und vom Klärwerk Steinhäule Abwasserproben vom Zulauf und nach jeder Reinigungsstufe vermessen.

1.7 Zielsetzung

Immunoassays basieren auf der selektiven Bindung eines Antigens (Analyten) an einen Antikörper. Die Selektivität der Antikörper, welche direkt die Richtigkeit der Ergebnisse bedingt, ist häufig aber nicht so gut wie für eine richtige Quantifizierung notwendig wäre. Überbestimmungen sind daher ein auftretendes Problem bei ihrer Anwendung. Eine Herausforderung bei der Verwendung von Immunoassays wie dem ELISA ist, dass die gesamte Probe vermessen wird und als Information lediglich ein einziger Signalwert erhalten wird. Ein Vergleich eines Analytsignals zu einem Untergrundsignal oder internem Standard ist im klassischen ELISA nicht möglich. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Methode zur Validierung von Immunoassays im Hinblick auf störende Interferenzen wie Matrixeffekte und Kreuzreaktanden zu entwickeln. Dabei sollte eine Kopplung von LC und ELISA angewendet werden. Das Potenzial dieser Methode (LC-ELISA) liegt darin, dass man ein Interferenzprofil (LC-ELISAGramm) ähnlich einem Chromatogramm erhält, was die Identifizierung von Interferenzen ermöglicht. Der entwickelte LC-ELISA sollte es erlauben ELISAs hinsichtlich Matrixeffekte zu validieren und gegebenenfalls helfen diese zu identifizieren. Eine Unterscheidung zwischen Kreuzreaktanden also spezifisch bindenden Stoffen und unspezifischen Interferenzen durch Anwendung des LC-ELISAs wäre wünschenswert. Es sollten die Notwendigkeit des LC-ELISAs und deren Grenzen diskutiert werden. Die bisher in der Literatur beschriebenen LC-Immunoassays erlaubten häufig keine oder nur eine sehr aufwendige Quantifizierung der Interferenzsignale. Zudem wurde die Quantifizierung häufig nicht genauer beschrieben und Ergebnisse einer Validierung hinsichtlich Quantifizierung fehlten. Der in dieser Arbeit zu entwickelnde LC-ELISA sollte daher neben der qualitativen auch eine quantitative Analyse ermöglichen. Die Richtigkeit der mittels LC-ELISA quantifizierten Analytgehalte sollte im Rahmen einer Validierung ebenfalls an Standards und Umweltproben gezeigt werden, wobei als Referenzmethode LC-MS/MS zum Einsatz kommen sollte. Nahezu alle in der Literatur bisher beschriebenen Methoden verwendeten relativ lange Fraktionierungsintervalle von mehr als 24 Sekunden. Innerhalb dieser Arbeit sollten auch kürzere Fraktionierungsintervalle bis hin zur gerätespezifischen Grenze von 3 Sekunden zum Einsatz kommen. Zur Minimierung des Arbeitsaufwandes und Kosten, welche für ein LC-ELISAGramm rund 10 € betragen, sollte die Reproduzierbarkeit getestet werden, um die Frage zu klären, ob eine Doppelbestimmung ausreichend genaue Aussagen zulässt. Für LC-ELISAs sollten geeignete Qualitätssicherungsmaßnahmen entwickelt werden, um eine Störung durch die LC-Separation beziehungsweise Fraktionssammlung und deren Behandlung ausschließen. Einflüsse der Probenbehandlung wie verwendete Puffer, Tracer oder Probenaufarbeitung könnten mit Hilfe des LC-ELISAs besser beurteilt werden.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Validierung des LC-ELISAs

Um Immunoassays hinsichtlich ihrer Matrixeffekte und Kreuzreaktanden durch Anwendung des LC-ELISAs validieren zu können, musste dieser zunächst selbst validiert werden. Dabei wurde der Fokus auf das Erkennen der Notwendigkeit des LC-ELISAs, dessen Grenzen, den Einfluss einer Leerprobe und die zu erwartende Präzision und Richtigkeit gelegt. Weiterhin wird die notwendige zeitliche Auflösung des LC-ELISAs diskutiert und ein Konzept vorgestellt, welches im Sinne einer Qualitätssicherung Fehler im LC-ELISA erkennen und ausgleichen soll.

2.1.1 Notwendigkeit und Grenzen des LC-ELISAs

Der LC-ELISA stellt im Vergleich zum ELISA eine deutlich zeitintensivere und teurere Messmethode dar. Es sollte daher zunächst stets untersucht werden, ob die Anwendung des LC-ELISAs notwendig ist. Ergebnisse dieser Arbeit und in der Literatur beschriebene Beobachtungen zeigen, dass insbesondere unspezifische Interferenzen durch die Verdünnung der Probe überproportional abgesenkt werden können. Daher bietet es sich an, die Probe bei unterschiedlichen Anreicherungs-faktoren zu vermessen und die erhaltenen Konzentrationen auf die unverdünnte Probe zu normalisieren. Die dabei erhaltenen Ergebnisse für Abwasserproben bei Vermessung mit dem SMX-ELISA sind in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: *Mittels ELISA und LC-MS/MS quantifizierte Sulfamethoxazolkonzentration in µg/L in Klärwerkszuläufen und -abläufen, wobei für die ELISA-Messungen die Proben unterschiedlich angereichert wurden (Ergebnisse auf einen Anreicherungsfaktor von 1 normiert) sowie das Konzentrationsverhältnis von ELISA (niedrigste gemessene Konzentration) zu LC-MS/MS-Messung*

Probe	2-fach	1-fach	0,5-fach	0,25-fach	LC-MS/MS	Verhältnis
Zulauf 2	29 ± 3	16 ± 2	11 ± 1	10 ± 1	0,41 ± 0,01	24
Zulauf 4	34 ± 1	15 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	0,46 ± 0,02	22
Zulauf 5	8,3 ± 0,3	6,0 ± 0,7	5,2 ± 0,6	5,2 ± 0,3	0,37 ± 0,00	14
Ablauf 2	9,8 ± 0,4	7,9 ± 0,6	8,0 ± 0,2	7,3 ± 0,4	0,22 ± 0,01	33
Ablauf 4	17 ± 1	11 ± 1	10,4 ± 0,2	10,7 ± 0,5	0,29 ± 0,01	36
Ablauf 5	9,7 ± 0,5	7,0 ± 0,7	7,0 ± 0,4	6,7 ± 0,4	0,21 ± 0,01	32

Es zeigte sich, dass bei Verdünnung der Probe die mittels ELISA gemessene normierte Konzentration abnahm. Dieser Effekt war besonders deutlich, wenn die Probe bei höheren Anreicherungs-faktoren vermessen wurde. Für schwächer

angereicherte Proben, konnte durch eine Verdünnung kaum noch eine signifikante Absenkung der normierten Konzentration erhalten werden. Die normierte Konzentration näherte sich einer Art Grenzwert an. Aus der stets signifikanten Differenz der normierten SMX-Konzentrationen bei Vermessung der Proben mit einem 2-fachen und 1-fachen Anreicherungsfaktor lässt sich ein Matrixeffekt erkennen, welcher auf eine Überbestimmung hindeutet. Das Maß der Überbestimmung kann jedoch nicht erkannt werden und ergibt sich erst beim Vergleich mit den SMX-Konzentrationen, welche mittels der Referenzmethode LC-MS/MS unter Verwendung der Stabilisotopenverdünnungsanalyse erhalten wurden. Die mittels ELISA ermittelten Ergebnisse liegen selbst beim Heranziehen der niedrigsten gemessenen Konzentrationen für die Zulaufe im Mittel etwa um den Faktor 20 und für die Abläufe etwa um den Faktor 34 zu hoch. Zudem ist zu erkennen, dass die Doppelbestimmung mittels ELISA, mit durchschnittlich etwa 7 %, deutlich höhere Standardabweichungen liefert als die Quantifizierung mittels LC-MS/MS mit etwa 2 %. Anhand der mittels ELISA deutlich höheren gemessenen Konzentrationen ist die Notwendigkeit des LC-ELISAs abzuleiten. Aber auch ohne Referenzmethode ist durch das disproportionale Konzentrationsverhalten eine fehlerhafte Quantifizierung erkennbar.

Bei der Quantifizierung von Estron in Abwässern wurden mittels ELISA im Vergleich zu LC-MS/MS ebenfalls Überbestimmungen erhalten. Dabei betrugen die Konzentrationsverhältnisse bei Zulaufproben Faktor 0,8-2,1 (im Durchschnitt 1,4) und bei Abläufen 0,9-3,4 (im Durchschnitt 2,3). Deutliche Überbestimmungen, mit starken Schwankungen für Proben mit ähnlicher Matrix, wurden auch schon früher in der Literatur beschrieben und untermauern die Notwendigkeit einer Methode zur Klärung des Sachverhalts [26].

Es darf jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass durch Einsatz des LC-ELISAs nur mit Einschränkungen die Gründe für fehlerhafte Quantifizierungen ermittelt werden können. Die Quantifizierung beim ELISA erfolgt durch Vergleich des erhaltenen Extinktionswerts der Probe zu einem Kalibrierstandard. Wenn sich wesentliche Parameter wie pH-Wert oder Anteil eines organischen Lösungsmittels in der Probe und im Kalibrierstandard unterscheiden, wird dies zu einer Fehlinterpretation führen. Bei der LC-Fraktionierung wird die Probe durch den Eluenten verdünnt, so dass der ursprüngliche pH-Wert und der Anteil an organischem Lösungsmittel nicht mehr rückverfolgt werden kann. Der pH-Wert aller Fraktionen wird mit einer Pufferlösung angeglichen und das Lösungsmittel entfernt. Nur in Ausnahmefällen bei sehr extremen pH-Werten oder hohen Anteilen an organischen Lösungsmitteln könnte durch eine schlechte LC-Separation der Signale das Vorhandensein dieser Störungen erkannt werden. Die LC-Separation kann aber auch weitere Einflüsse

haben. In der Literatur ist beschrieben, dass Antikörper zu Interferenzen führen können. Durch Einsatz organischer Lösungsmittel während der LC könnten diese denaturieren und so ihr Potenzial zur Ausbildung einer Interferenz verlieren. Bei der Wahl der LC-Parameter wie Eluenten und Säulentemperatur sollte auch auf mögliche Spaltungen von Stoffen geachtet werden. Relativ labile Metaboliten wie Sulfate oder Glucuronide könnten durch stark saure Bedingungen oder hohe Temperaturen während der LC-Separation gespalten werden, wobei die Spaltungsprodukte deutlich geringere Kreuzreaktivitäten aufweisen könnten. Innerhalb dieser Arbeit wurden Eluenten mit einem pH-Wert zwischen 4,5 und 8 sowie eine Säulentemperatur von 40 °C bzw. 50 °C verwendet. Auch eine mögliche Bildung von Methylestern durch Verwendung von Methanol und Säure als Eluent sollte nicht vernachlässigt werden. Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend im auf 30 °C erwärmten Gasstrom bis zur Trockne eingengt, was eine zusätzliche thermische Zersetzung der Stoffe minimiert. Jedoch könnten dabei leicht flüchtige Stoffe entfernt werden.

Durch Vermessung der Probe bei unterschiedlichen Verdünnungen kann über die disproportionale Konzentrationsänderung, besonders bei hohen Anreicherungs-faktoren, das Vorhandensein von Interferenzen erkannt werden. Idealerweise sollte ein Vergleich zu einer mittels Referenzmethode erhaltenen Konzentration aufgestellt werden. Es sollten stets mehrere Proben einer Matrixart getestet werden, weil die Überbestimmungen für ähnliche Matrices stark schwanken können. Der LC-ELISA bietet das Potenzial, Interferenzen aufzudecken, aber die Probe kann durch die LC-Separation in dem Maße verändert werden, dass Interferenzen eliminiert werden. Vorstellbar sind beispielsweise die Denaturierung von Antikörpern bzw. Proteine, die Neutralisation extremer pH-Werte oder die Spaltung stark interferierenden Metaboliten zum weniger stark interferierenden Analyten.

2.1.2 Kontrollmöglichkeiten innerhalb des LC-ELISAs

In diesem Abschnitt soll ein wichtiger Bestandteil des entwickelten LC-ELISAs, die Art der Fraktionierung in die Mikrotiterplatte, vorgestellt werden. Die in dieser Arbeit entwickelte Form wurde bisher nicht beschrieben, wie allgemein das Format der Fraktionierungen in der Literatur gar nicht oder nur unzureichend beschrieben ist. Das entwickelte Konzept der Fraktionierung erlaubt neben einer sicheren Quantifizierung auch die Überwachung einiger kritischer Störmöglichkeiten. Immunoassays wie der ELISA basieren auf einem komplexen Schichtsystem von häufig mehreren Antikörpern und einem Antigen. Der Assay besteht aus vielen Arbeitsschritten wie in Abbildung 1 gezeigt. Diese Komplexität erschwert die Identifizierung eines Fehlers. Es ist daher wichtig, dass durch die Verwendung des

LC-ELISAs die Anzahl der unkontrollierten Arbeitsschritte nicht weiter zunimmt. In Abbildung 7 ist die neu entwickelte Art der Auftragung von Fraktionen und Standards schematisch gezeigt.

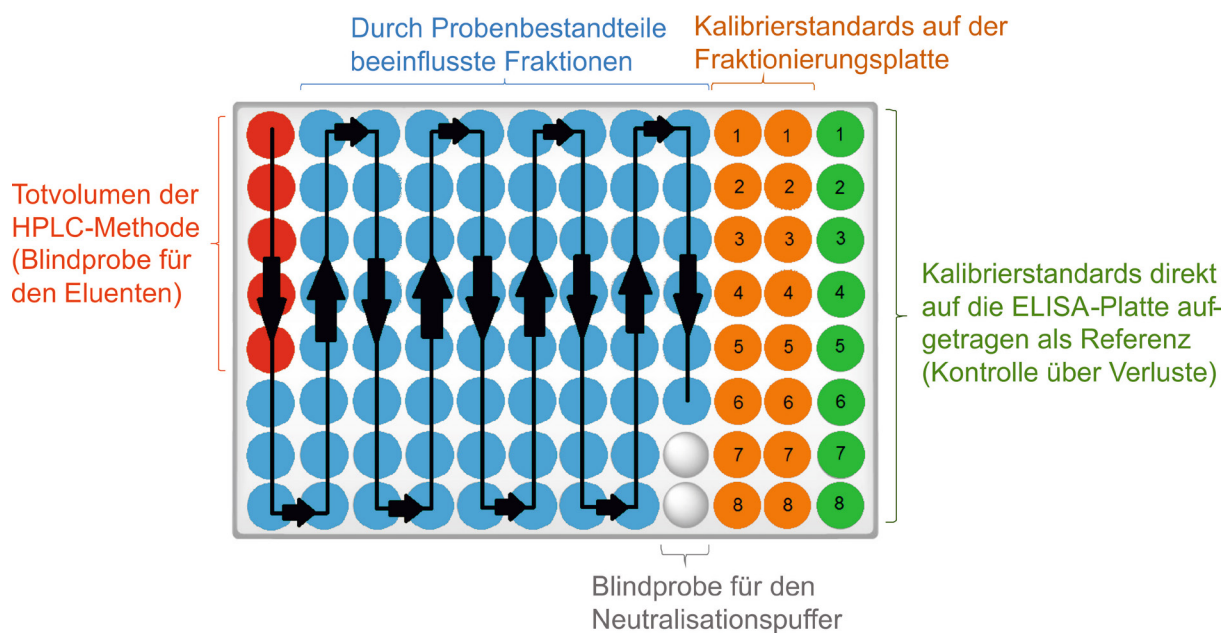


Abbildung 7: Schema zum Verlauf der Fraktionssammlung (schwarze Linie), Auftragung von Standards und leere Kavitäten (weiß) mit der Beschreibung ihrer Bedeutung.

Die Fraktionierung erfolgte in eine Mikrotiterplatte mit 96 Kavitäten nach Spalten, wobei stets der kürzeste Abstand zwischen zwei Kavitäten gewählt wurde. In die Kavitäten wurde ein Neutralisationspuffer ($\text{pH} = 7,6$) vorgelegt, um die nach der LC-Separation aufgefangenen Fraktionen direkt zu neutralisieren und abzukühlen. Das Zeitintervall und das Zeitfenster der Fraktionierung wurden so gewählt, dass 70 Fraktionen mit zeitlich äquidistanten Abständen gesammelt wurden. Die zeitliche Äquidistanz ist wichtig, damit die gleiche Menge an Eluent gesammelt wird. Dies ermöglicht erst den sicheren Vergleich der gemessenen Konzentrationen in den Kavitäten und stellt sicher, dass in allen Kavitäten der gleiche Misch-pH-Wert und die gleichen Salzkonzentrationen vorliegen. Eine Tatsache die besonders bei Verwendung von gepufferten Eluenten wichtig ist und in vielen bisher in der Literatur beschriebenen Arbeiten nicht berücksichtigt und diskutiert wurde. Bei der Sammlung von 70 Fraktionen bleiben zwei Fraktionen (grau) in der Spalte 9 vakant. Die beiden Fraktionen sind von der Fraktionierung nicht beeinflusst und dienen als Kontrolle, ob der Neutralisationspuffer eventuell unerwartete positive Signale liefert. Die Fraktionierung sollte zumindest zweimal ab Elutionszeit 0 min erfolgen. Die dabei zuerst gesammelten Fraktionen (rot) repräsentieren die Totzeit der LC-Anlage und können daher nicht von der Probe und nur vom LC-System und den Eluenten beeinflusst werden. Diese Fraktionen stellen eine Kontrolle der Belastung der Eluenten und des LC-Systems dar. In Spalte 10 und 11 werden Kalibrierstandards

als Doppelbestimmung aufgebracht. Dabei wurde der Analyt in einer Mischung von Eluent und Neutralisationspuffer gelöst, wie sie für die gesammelten Fraktionen vorlag, um auch dort eine fehlerhafte Beeinflussung durch unterschiedliche pH-Werte oder Salzkonzentrationen auszuschließen. Diese Kalibrierstandards werden auf die Fraktionierungsplatte aufgebracht und dienen als eine Art interner Standard. Der Analyt in den Standards könnte wie in den Fraktionen durch vorherige Kontamination der Platte, Adsorption an der Platte, der anschließenden Lagerung, Entfernen des Lösungsmittels und Wiederaufnahme in Reinstwasser beeinflusst werden. Die Auftragung der Standards in Spalte 10 und 11 kann diese Effekte zumindest teilweise ausgleichen. Darüber hinaus sind aufgrund der vielen Standards und der sich daraus ergebenden Kalibrierfunktion einzelne zufällige Interferenzen ebenfalls detektierbar. Die Spalte 12 der für die Fraktionssammlung verwendeten Mikrotiterplatte bleibt vakant. Kalibrierstandards wurden erst bei der Vermessung der Fraktionen direkt auf der antikörperbeschichteten ELISA-Platte in die Spalte 12 aufgetragen. Sie können als nicht kontaminiert angesehen werden und sind so ein Test über die Funktionsfähigkeit des ELISAs. Außerdem können sie als Referenz zu den von der Fraktionierungsplatte übertragenen Kalibrierstandards dienen und so Verluste während der Behandlung der Fraktionen gemessen werden.

In dieser Arbeit wurden zur Sammlung der Fraktionen zwei unterschiedliche Mikrotiterplatten getestet. Zum einen unbehandelte Platten aus Polystyrol und zum anderen mit Glas beschichtete Platten. In Tabelle 3 sind ausgewählte Ergebnisse dargestellt, welche erhalten wurden, wenn man mit Hilfe der Standards in Spalte 10 und 11 die Konzentrationen der Standards in Spalte 12 ermittelt.

Tabelle 3: *Gemessene SMX-Konzentration in $\mu\text{g/L}$ der Kalibrierstandards (Kontrolle über Verluste) bei Quantifizierung mittels Kalibrierstandards von der Fraktionierungsplatte bei Verwendung von unbehandelter Platte und glasbeschichteter Platte*

Konzentration	Unbehandelte Platte	Glasbeschichtete Platte
5	$5,7 \pm 1,4$	$5,1 \pm 0,2$
2	$2,3 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
0,5	$0,68 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,03$

Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung der unbehandelten Platte geringe Überbestimmungen erhalten wurden. Dies deutet daraufhin, dass es zu geringen Verlusten an Analyt beispielsweise durch Adsorption an der Platte kommt. Aus einem Verlust an Analyt in den Standards die zur Quantifizierung herangezogen werden, folgt eine Überbestimmung der Konzentration für die Standards die nur auf die ELISA-Platte aufgetragen werden und dementsprechend keine reduzierte Konzentration aufweisen. Die Überbestimmungen liegen jedoch in etwa im Bereich

der typischen Unsicherheiten des ELISAs um 10 %. Die erhaltenen Konzentrationen bei Verwendung der glasbeschichteten Platte lagen bei den erwarteten Konzentrationen. Lediglich für den Standard mit 0,5 µg/L war eine geringe Überbestimmung messbar. Jedoch liegt diese Konzentration auch schon leicht unterhalb des gut quantifizierbaren Bereichs des SMX-ELISAs. Bei der Anwendung des LC-ELISAs zur Quantifizierung von Estron konnten ebenfalls unter Verwendung von unbehandelten Platten Abweichungen von etwa 10 % zwischen der gemessenen und der erwarteten E1-Konzentration für die Referenzkalibrierstandards (Spalte 12) erhalten werden. Der Gebrauch der unbehandelten Platten ist daher möglich. Diese Mikrotiterplatten sollten jedoch nur einmalig benutzt werden.

Als Einschränkung des Konzepts zur Überwachung von Verlusten ist zu nennen, dass dies nur den Zielanalyten aber nicht interferierende Stoffe umfassen kann. Kreuzreaktanden oder unspezifisch bindende Stoffe könnten stärker an der unbehandelten Platte adsorbieren. In Abbildung 8 ist daher ein Vergleich von SMX-LC-ELISAGrammen von Abwässern unter Verwendung von unbehandelter und glasbeschichteter Platte zur Sammlung der Fraktionen gezeigt.

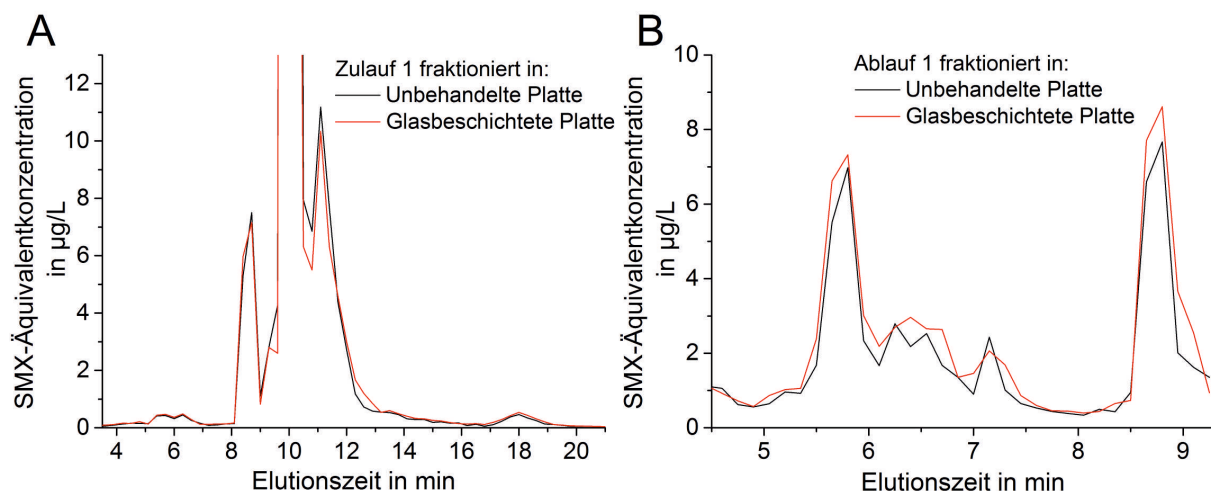


Abbildung 8: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen erhalten bei Verwendung von unbehandelter und glasbeschichteter Platte für eine 10-fach angereicherte (A) Klärwerkszulaufprobe und (B) Klärwerksablaufprobe unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Die LC-ELISAGramme zeigen den Bereich der Elutionszeit welcher Signale mit SMX-Äquivalentkonzentrationen im gut quantifizierbaren Bereich des SMX-ELISAs lieferte. Es ist zu erkennen, dass die mittels LC-ELISA gemessenen Konzentrationen für beide Platten im Rahmen der für den ELISA typischen Messunsicherheit von etwa 10 % lagen und damit als gleich angesehen werden können.

Es wurde eine Art der Auftragung entwickelt, welche eine Kontrolle über Kontaminationen des Eluenten beziehungsweise LC-Systems und der für die Neutralisation der Fraktionen verwendeten Pufferlösung ermöglicht. Um weitere Störeinflüsse zu identifizieren, wurden Kalibrierstandards erst auf die antikörperbeschichtete ELISA-Platte aufgetragen und mit Standards verglichen, welche schon auf die Fraktionierungsplatte aufgetragen wurden. Der Einfluss der Fraktionierungsplatte auf die Interferenzprofile wurde anhand von Proben eines Klärwerkszulaufs und -ablaufs mittels LC-ELISA vermessen. Die erhaltenen SMX-LC-ELISAGramme waren im Rahmen der Messunsicherheit für beide Arten der Mikrotiterplatte gleich. Da das Verhalten von unbekannten Interferenzen nicht vorhergesagt werden kann, sollten in Zukunft glasbeschichtete Platten zur Sammlung der Fraktionen verwendet werden. Es sei denn, dass eine Adsorption des Analyten an Glas bekannt ist. Es zeigte sich, dass ein 4-faches manuelles Waschen mit fließendem Reinstwasser, was etwa einer 500 000-fachen Verdünnung entspricht, ausreichend ist, um anschließend keine signifikanten Analytkonzentrationen messen zu können. Von einer automatischen Reinigung der Mikrotiterplatten mittels Plattenwasher ist abzuraten, da dieser die Positionen seiner Waschdüsen über einen Kontakt mit der Platte testen könnte und so die Gefahr einer Beschädigung der dünnen Glasbeschichtung besteht.

2.1.3 Präzisionsprofil

An dieser Stelle soll vorgestellt werden, wie der für die Quantifizierung sinnvolle Konzentrationsbereich eines ELISAs ermittelt wurde. Dazu kann ein sogenanntes Präzisionsprofil verwendet werden [87]. Dieses folgt dem Ansatz, dass die Unsicherheit der Konzentration (Δx) mit der Unsicherheit (Standardabweichung s) der gemessenen Extinktion und den Parametern der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard wie in Gleichung 3 beschrieben zusammenhängt.

$$\Delta x = \frac{s}{B \cdot (D - A)} \cdot \left[\left(\frac{C}{x} \right)^B + 2 + \left(\frac{x}{C} \right)^B \right] \quad (\text{Gleichung 3})$$

In Abbildung 9 sind eine Kalibrierfunktion und die sich aus Gleichung 3 für die Kalibrierpunkte ergebenden relativen Unsicherheiten dargestellt. Diese folgen, bei logarithmischer Austragung der Konzentration auf der x-Achse, einem U-Verlauf. Für Bereiche in denen die Steigung der Kalibrierfunktion klein ist, wird die relative Unsicherheit der Konzentration maximal.

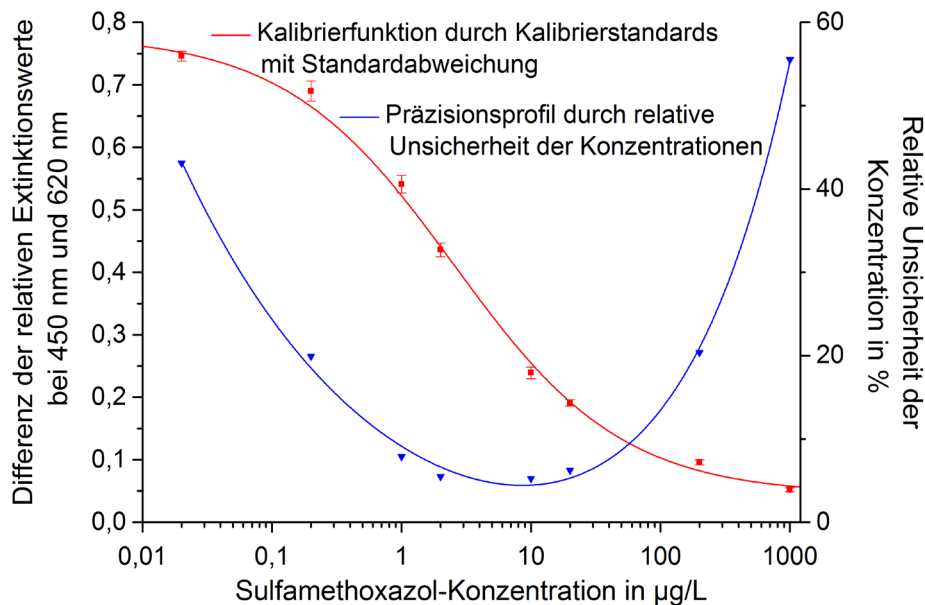


Abbildung 9: Kalibrierfunktion für den SMX-ELISA (rote Linie) und nach Gleichung 3 errechneten Unsicherheit der Konzentrationen (\blacktriangledown), welche nach Gleichung 4 einer neu entwickelten Anpassungsfunktion verbunden wurden (blaue Linie).

Die Berechnung der Präzision der Konzentration (Gleichung 3), wie sie Ekins (1981) beschreibt, ist seit längerem bekannt, jedoch war in der Literatur keine entsprechende Anpassungsfunktion zu finden. In der Vergangenheit wurde diese häufig manuell gezeichnet oder eine unharmonische Punkt-zu-Punkt-Verknüpfung angewendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Anpassungsfunktion entwickelt (Gleichung 4).

$$y = A \cdot x^B + C + \frac{D}{x^E} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Beim Präzisionsprofil handelt es sich vereinfacht um eine Parabel, wobei die Schwierigkeit besteht diese bei der logarithmischen x-Achse abzubilden. Die Gleichung 4 besteht aus den Variablen x für die Analytkonzentration, y für die relative Unsicherheit der Konzentration sowie A , B , C , D und E , welche frei wählbar sind und in keinem Zusammenhang mit den 4 Parametern der 4-Parameter-Gleichung nach Rodbard stehen. Es hat sich gezeigt, dass die Exponenten B und E teilweise zu unerwünschten Fehlanpassungen führen können. Durch deren Festsetzung mit einem Wert von 1 und damit dem Ignorieren der beiden Exponenten, kann dieses Problem jedoch beseitigt werden. Um aus dem Präzisionsprofil den für die Quantifizierung nutzbaren Konzentrationsbereich festzulegen, wurde für die Quantifizierung ein maximaler Fehler von 10 % und für den Arbeitsbereich ein

akzeptabler Fehler von 30 % gewählt, welche auch in der Literatur vorgeschlagen wurden [88]. Bei Anwendung dieser Kriterien ergaben sich für die drei, in dieser Arbeit verwendeten, ELISAs die in Tabelle 4 gezeigten Konzentrationsbereiche.

Tabelle 4: *Konzentrationsbereiche in µg/L, die signifikante Aussagen und Quantifizierungen für die in der Arbeit verwendeten Enzyme-linked Immunosorbent Assays zulassen und die Konzentration am Wendepunkt der Kalibrierfunktion (C-Wert)*

ELISA für	Untere Signifikanzgrenze (Unsicherheit < 30 %)	Quantifizierbarer Bereich (Unsicherheit < 10 %)	C-Wert
Sulfamethoxazol	0,06	0,82-63	2,5
Estron	0,06	0,15-8,7	0,96
Carbamazepin	0,01	0,04-0,98	0,15

Neben den Konzentrationsbereichen ist auch der C-Wert von wesentlicher Bedeutung. Der Anstieg der Kalibrierfunktion ist bei semilogarithmischer Auftragung dort maximal und damit die Messunsicherheit am C-Wert vermeintlich am niedrigsten. Gemessene Konzentrationen unter 60 ng/L für den SMX- und E1-ELISA beziehungsweise unter 10 ng/L für den CBZ-ELISA sollten als nicht signifikant gewertet werden. Es muss erwähnt werden, dass die Standardabweichungen und die 4 Parameter der 4-Parameter-Gleichung um typischerweise bis zu einem Faktor von 2 schwanken können und damit auch der quantifizierbare Bereich und die untere Signifikanzgrenze Schwankungen unterliegen. Die angegebenen Werte spiegeln die typisch erhaltenen Werte wieder, sollten aber nur als Näherungswerte angesehen werden.

Mit Hilfe eines Präzisionsprofils wurden die Konzentrationen der Signifikanzgrenzen und gut quantifizierbaren Bereiche der verschiedenen ELISAs ermittelt. Dafür wurde eine Anpassungsfunktion entwickelt, die die errechneten relativen Unsicherheiten der Konzentrationen fittet und so eine genauere Bestimmung der Grenzen für die jeweiligen ELISAs ermöglicht.

2.1.4 Leerproben

Der erste Schritt bei der Anwendung des LC-ELISAs sollte, nach Entwicklung der HPLC-Methode, die Vermessung einer Leerprobe sein. Diese stellt eine Art Profil der Untergrundsignale dar, welche später maßgeblich die Aussagekraft von erhaltenen Interferenzsignalen beeinflussen können. Bei Verwendung des Präzisionsprofils und Beachtung des signifikanten Konzentrationsbereiches können die erhaltenen LC-ELISAGramme von Leerproben beurteilt werden. In Abbildung 10 sind die

erhaltenen LC-ELISAGramme für SMX und CBZ bei Vermessung einer Leerprobe gezeigt.

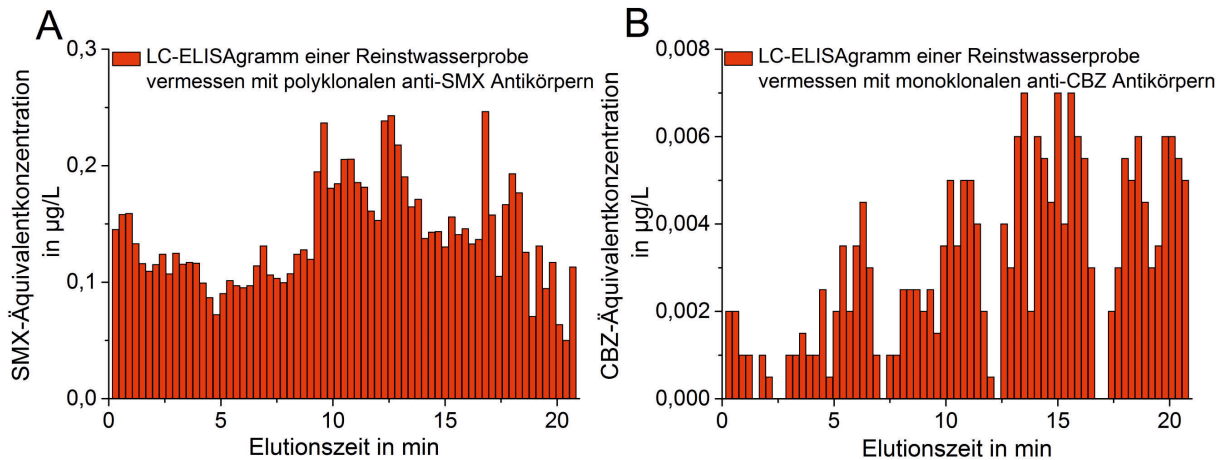


Abbildung 10: LC-ELISAGramm für eine Leerprobe unter Anwendung der HPLC-Methode 1 und Gebrauch des (A) SMX-LC-ELISAs und (B) CBZ-LC-ELISAs.

Für beide Analyten waren für mehrere Fraktionen positive Signale messbar. Dabei lagen die Signalintensitäten bei Verwendung der polyklonalen anti-SMX Antikörper sogar deutlich oberhalb der Signifikanzgrenze von 0,06 µg/L. Bei Verwendung der monoklonalen anti-CBZ Antikörper lagen die Signale jedoch unterhalb der Signifikanzgrenze. Teilweise war unter Verwendung der Kalibrierfunktion keine Konzentrationsbestimmung mehr möglich, was der Grund für die Lücken im CBZ-LC-ELISAGramm ist. Die Notwendigkeit der Vermessung einer Leerprobe kann gut am Beispiel des E1-LC-ELISAGramm in Abbildung 11 gezeigt werden.

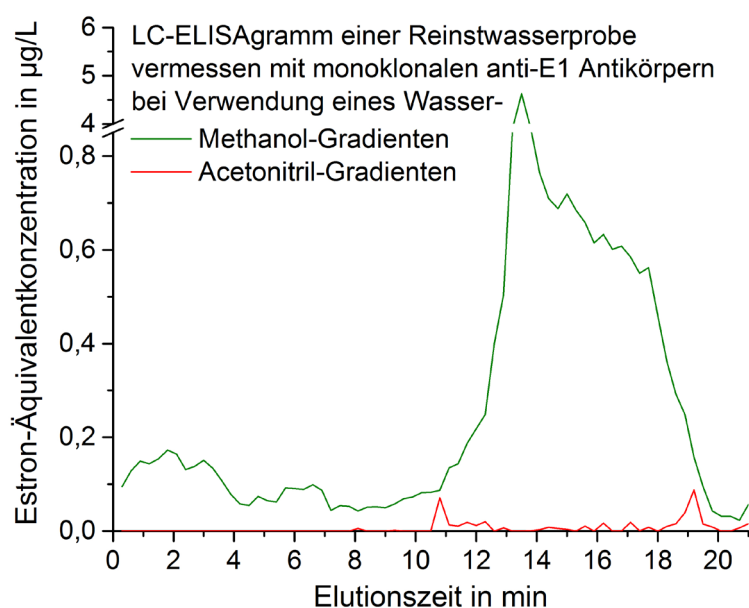


Abbildung 11: E1-LC-ELISAGramm für eine Leerprobe bei Verwendung der HPLC-Methode 1 (grüne Linie) und HPLC-Methode 2 (rote Linie).

Unter Verwendung der gleichen HPLC-Methode wie für die LC-ELISA-Messungen mit SMX- und CBZ-ELISA ergibt sich bei Anwendung des monoklonalen anti-E1 Antikörpers ein sehr intensives Untergrundprofil für die Leerprobe. Man beachte die Unterbrechung der y-Achse. Das sehr intensive Signal bei 13,5 min war an unterschiedlichen Tagen reproduzierbar und kann nicht durch E1 hervorgerufen sein, welches bei 13,0 min eluiert. Da es sich um eine Leerprobe handelt und die Fraktionen auch erst nach mehreren Äquilibrationsseparationen gesammelt wurden, muss die Interferenz durch den Eluenten oder das LC-System hervorgerufen werden. Der verwendete Gradient der HPLC-Methode 1 besteht aus einem isokratischen Verlauf mit 20 % MeOH für die ersten 3 min und steigt danach linear auf 95 % MeOH zur Minute 8 an. Anschließend bleibt er stabil bei 95 % MeOH bis zur Minute 12 und sinkt wieder auf 20 % MeOH ab. Da ein Intensitätsanstieg der Interferenzsignale von Minute 3 zu 8 jedoch nicht erkennbar ist, kann ein Zusammenhang mit dem Eluenten ausgeschlossen werden. Die starke Interferenz muss durch Stoffe des LC-Systems hervorgerufen werden. Vorstellbar wäre, dass unpolare Stoffe wie Weichmacher aus dem System gelöst werden. Mit ansteigendem Anteil an MeOH werden sie immer stärker gelöst und reichern sich auf der analytischen Säule an. Erst nach längerem Spülen der Säule mit 95 % MeOH eluieren die Stoffe bei Minute 13,5. Dies erklärt auch das schmale Signal. Da der Gradient anschließend wieder hauptsächlich aus Wasser besteht, welches die unpolaren Stoffe schlecht eluiert, wird eine breite Signalschulter erhalten. Aufgrund der hohen Interferenzsignale in der Leerprobe müssten die Interferenzsignale, welche durch die Probeninhaltsstoffe hervorgerufen werden, sehr intensiv sein. Dies würde eine hohe Anreicherung der Probe und geringe Nachweisempfindlichkeit mit sich führen. Um dies zu vermeiden wurde ein Gradient aus Wasser und Acetonitril (HPLC-Methode 2) getestet. Dadurch konnten die Interferenzintensitäten, welche für die Leerprobe erhalten wurden, um mehr als Faktor 50 abgesenkt werden. Lediglich in sehr wenigen Fraktionen wurden Konzentrationen knapp über der Signifikanzgrenze von 0,06 µg/L gemessen. Weshalb die für die sehr hohen Interferenzsignale verantwortlichen Stoffe mit Acetonitril nicht eluiert werden, bleibt ungeklärt. Es könnte sein, dass die Änderung des pH-Werts von 4,5 zu 8 einen Einfluss hat. Die gewählten Bedingungen sollten jedoch nicht nur für die LC-ELISA-Messung geeignet sein, sondern auch für die Referenzmethode (LC-MS/MS). Durch Wechsel des organischen Lösungsmittels von MeOH zu ACN konnte die durch Matrixbestandteile hervorgerufene Signalsuppression verringert werden. Die Änderung des Modifiers von 0,1 % Essigsäure mit 10 mM Ammoniumacetat zu 0,00025 % Ammoniak führte darüber hinaus zu einer Signalintensitätssteigerung von Estron für die LC-MS/MS-Messung um etwa Faktor 50. Durch diese beiden Optimierungsschritte war es erst möglich die guten Bestimmungsgrenzen in den angereicherten Proben von etwa 10 ng/L in Klärwerkszuläufen, etwa 3 ng/L in

Klärwerksabläufen und etwa 0,4 ng/L E1 in Oberflächenwasser zu erreichen. Diese als vergleichsweise gut einzuschätzenden Bestimmungsgrenzen [83] waren notwendig, und für Klärwerksablaufproben teilweise nicht ausreichend gut, um die E1-Gehalte in den Umweltproben mittels LC-MS/MS quantifizieren zu können.

Bei Vermessung von Leerproben mittels E1-LC-ELISA zeigte sich ein deutlicher Einfluss der verwendeten Eluenten auf das LC-ELISAGramm. Durch Substitution des Wasser-MeOH-Gradienten durch einen Wasser-ACN-Gradienten konnten die Interferenzsignale im LC-ELISAGramm um bis zu Faktor 50 abgesenkt werden. Lediglich bei Verwendung des polyklonalen anti-SMX Antikörpers wurden für die Vermessung einer Leerprobe noch viele Fraktionen mit Signalkonzentrationen oberhalb der Signifikanzgrenze erhalten.

2.1.5 Präzision und Richtigkeit

Es war die Frage zu klären, ob eine Doppelbestimmung ausreichend genaue Aussagen ermöglicht. Die Kosten der Datengenerierung eines LC-ELISAGramms betragen in Summe etwa 10 €. Da mindestens eine Doppelbestimmung durchgeführt werden sollte, um eine verlässliche Aussage zu erhalten, stellte sich die Frage, ob diese auch ausreichend ist, oder eine Mehrfachbestimmung mit einer größeren Anzahl an Wiederholmessungen notwendig wäre. Die Kosten einer Doppelbestimmung betragen pro Probe etwa 20 € und erhöhen sich um 10 € mit jeder zusätzlichen Wiederholung. Da der LC-ELISA nicht vorrangig zur Quantifizierung, sondern eher zur qualitativen Beurteilung von Matrixeffekten dienen soll und darüber hinaus aus dem Präzisionsprofil eine Unsicherheit von bis zu 30 % im Arbeitsbereich angenommen werden kann, wurde eine Standardabweichung von 25 % für Mehrfachbestimmungen als akzeptabel festgelegt. Um die Wiederholpräzision abzuschätzen, wurde ein Standard mit einer Konzentration von 10 µg/L SMX als Dreifachbestimmung mittels SMX-LC-ELISA vermessen. Durch die in Abschnitt 1.5 dargestellte Verdünnung um den Faktor 5 während der LC-Separation ergibt sich eine zu erwartende Konzentration von 2 µg/L SMX. Das erhaltene gemittelte LC-ELISAGramm mit den entsprechenden Standardabweichungen für die einzelnen Fraktionen ist in Abbildung 12 dargestellt.

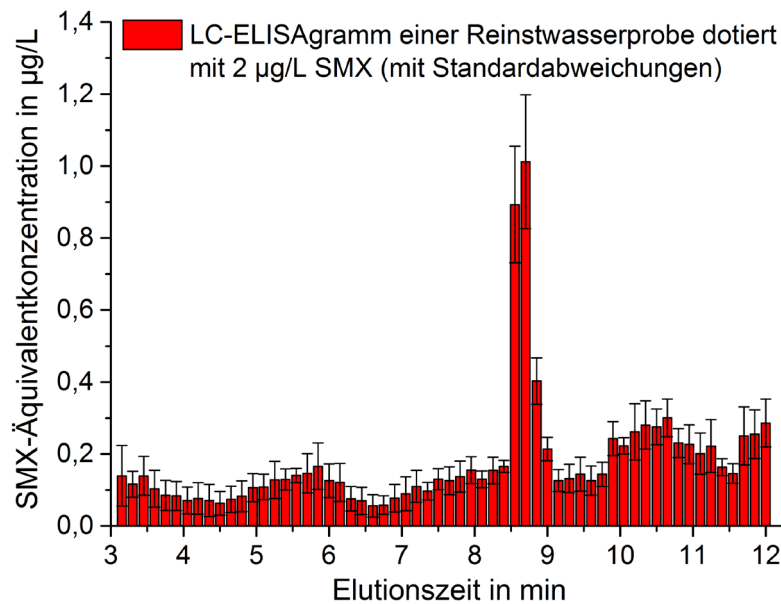


Abbildung 12: SMX-LC-ELISAGramm für eine mit SMX dotierte Leerprobe mit Angabe der Standardabweichungen einer Dreifachbestimmung unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Das SMX-Signal ist um 8,7 min zu erkennen und verteilt sich auf 2 bzw. 3 Fraktionen. Die Signalbreite entspricht etwa 24 s und das Fraktionsintervall 9 s. Die in Tabelle 1 vorgestellten Kriterien der Richtlinie 2002/657/EG, dass ein LC-Immunogramm aus mindestens 5 Fraktionen bestehen muss und jede Fraktion kleiner als die Hälfte der Peakbreite sein muss, sind erfüllt. Die relativen Standardabweichungen für die Fraktionen, die SMX repräsentieren, betragen 18 %. Für alle übrigen Fraktionen liegen sie bei 10-63 %. Dabei ist zuzusagen, dass die hohen relativen Standardabweichungen für sehr geringe Konzentrationen erhalten wurden, welche auch schon unterhalb des Arbeitsbereiches liegen. Die erhaltenen Standardabweichungen können als akzeptabel angesehen werden. Aus Kosten- und Zeitgründen ist eine Doppelbestimmung für alle Proben zweckmäßig. Es wird bei allen in dieser Arbeit dargestellten LC-ELISAGrammen der Mittelwert der Doppelbestimmung gezeigt. Bei der Vermessung von Realproben lagen die relativen Standardabweichungen, der sich im Arbeitsbereich befindenden Konzentrationen, bis auf wenige Ausnahmefälle, ebenfalls für alle Fraktionen unter 25 %.

Der LC-ELISA soll im Gegensatz zu schon in der Literatur beschriebenen Ansätzen auch zur quantitativen Analyse dienen, weshalb neben der Wiederholpräzision auch die Richtigkeit der gemessenen Konzentrationen von wesentlicher Bedeutung ist. Summiert man die in den drei Fraktionen um 8,7 min erhaltenen Konzentrationen, wobei die Konzentration in der letzten Fraktion schon unterhalb des gut quantifizierbaren Bereichs liegt, ergibt sich ein Wert von $2,3 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ SMX. Die erwartete Konzentration von $2 \mu\text{g/L}$ wird im Rahmen der Messunsicherheit erreicht.

Es wird aber im Mittel eine leichte Überbestimmung erhalten. Da jede Fraktion für sich eine einzelne Probe darstellt, kann nicht von einem klassischen Signal-zu-Rausch-Verhältnis, beim Vergleich von zwei Fraktionen, gesprochen werden. Es ist jedoch nachvollziehbar und wurde auch bei der Vermessung der Leerproben gezeigt, dass in den drei Fraktionen um 8,7 min eine signifikante SMX-Konzentration bei Abwesenheit von SMX gemessen werden würde. In dieser zusätzlichen Konzentration ist die leichte Überbestimmung begründet. Da der LC-ELISA auch zur Vermessung von Umweltproben angewendet wurde und diese auf natürliche Weise belastet sind, wurde zur Quantifizierung der Gehalte in den Umweltproben LC-MS/MS, unter Verwendung der Stabilisotopenverdünnungsanalyse, als Referenzmethode eingesetzt. Diese Methode ist eine weit verbreitete Methode und die erhaltenen Konzentrationen werden typischerweise als richtig angenommen. Die mittels LC-ELISA und LC-MS/MS quantifizierten Gehalte wurden gegeneinander aufgetragen und die Datenpaare gefittet. Die erhaltenen Funktionsgleichungen und mittleren Wiederfindungen, abhängig von Matrix und Analyt, sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: *Ergebnisse zur erhaltenen Korrelation (Ausgleichsfunktion und Bestimmtheitsmaß R^2) bei Auftragung der gemessenen Konzentrationen von Sulfamethoxazol beziehungsweise Estron mittels LC-ELISA gegen LC-MS/MS sowie der Mittelwert der Wiederfindungen*

Probenart (Anzahl der Proben)	Ausgleichsfunktion	R^2	Mittelwert der Wiederfindungen von LC-ELISA zu LC-MS/MS in %
<i>Sulfamethoxazol</i>			
Klärwerkszulauf (6)	$y = 1,06x - 0,02$	0,99	104 ± 13
Klärwerksablauf (6)	$y = 1,18x + 0,61$	0,99	114 ± 20
Oberflächenwasser (6)	$y = 0,98x + 0,58$	0,95	110 ± 9
<i>Estron</i>			
Klärwerkszulauf (6)	$y = 0,89x + 12,3$	0,98	103 ± 8
Klärwerksablauf (4)	$y = 0,93x + 2,89$	0,97	132 ± 26
Oberflächenwasser (5)	$y = 1,32x - 0,03$	0,94	113 ± 44

Es ist zu erkennen, dass die hohen Überbestimmungen die bei Verwendung des klassischen ELISAs (Tabelle 2) auftraten, durch Anwendung des LC-ELISAs fast vollständig eliminiert werden konnten. Lediglich für Klärwerksabläufe wurden im Mittel leichte Überbestimmungen erhalten. Der Grund dafür lag in den relativ niedrigen Analytkonzentrationen, bei gleichzeitig relativ intensiven Signalen in den LC-ELISAGrammen nahe der Elutionszeit des Analyten, begründet. Wie auch bei der Wiederholpräzision kann anhand der guten Bestimmtheitsmaße von 0,94-0,99 die gute Robustheit des LC-ELISAs gezeigt werden. Eine relativ hohe Streuung der Wiederfindungen wurde bei Vermessung der Oberflächenwasserproben mittels

E1-LC-ELISA erhalten. Die Ursache dafür wird höchstwahrscheinlich in den niedrigen E1-Konzentrationen von etwa 0,5-4 ng/L liegen, welche für LC-ELISA und LC-MS/MS nahe ihrer Bestimmungsgrenze lagen.

Eine interessante Frage, welche sich im Zuge der Quantifizierung stellt, ist ob die Summe aller Interferenzsignale eines LC-ELISAGramms, der bei der Vermessung der gesamten Probe erhaltenen Konzentration entspricht. Da lediglich für Klärwerksproben die mittels E1-ELISA vermessen wurden im LC-ELISAGramm alle Konzentrationen der signifikanten Signale im Arbeitsbereich lagen, kann nur auf Basis dieser Daten eine Schlussfolgerung gezogen werden. Beim Vergleich der Klärwerkszulaufproben, gemessen mit gleichem Anreicherungsfaktor, ergab sich für die Summe der Signale im LC-ELISAGramm eine Konzentration die 68 % höher lag, als die gemessene Konzentration mittels klassischem ELISA. Für die Klärwerksabläufe lag die Summe der LC-ELISA-Signale im Durchschnitt 247 % höher als die erhaltene Konzentration bei Vermessung der Gesamtprobe. Es werden eindeutig voneinander verschiedene Konzentrationen erhalten. Der Grund dafür ist in der Separation der Probeninhaltsstoffe zu suchen. Bei Vermessung der gesamten Probe stellt sich eine Gleichgewichtsverteilung zwischen Antikörperbindungsstellen und allen Probeninhaltsstoffen ein. Werden die Probeninhaltsstoffe voneinander separiert, verschieben sich die Gleichgewichte, weil sich die Anzahl der bindenden „Konkurrenten“ in der zu vermessenden Fraktion verändert. So binden nach LC-Separation unter Umständen auch Stoffe, welche eine geringere Affinität zum Antikörper besitzen und bei Vermessung der gesamten Probe von anderen Stoffen von den Bindungsstellen verdrängt werden würden. Es ist auch denkbar, dass antikörperaffine Stoffe ebenfalls an Probeninhaltsstoffe wie Proteine oder andere Makromoleküle binden könnten. Werden die Stoffe voneinander separiert, bindet der antikörperaffine Stoff nun vermehrt an den Antikörper und führt zu einer messbaren Konzentration.

Es konnte gezeigt werden, dass die Wiederholpräzision des LC-ELISAs ausreichend gut ist, um mittels Doppelbestimmung verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Die relativen Standardabweichungen betrugen dabei unter 25 % und lagen in einem Bereich, welcher auf Basis des Präzisionsprofils zu erwarten war. Die in Umweltproben mittels LC-ELISA ermittelten Analytkonzentrationen waren in guter Übereinstimmung mit denen, welche mittels LC-MS/MS ermittelt wurden. Der LC-ELISA kann daher auch zur Quantifizierung eingesetzt werden. Wie schon in der Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission vorgeschlagen, sollte eine sichere Quantifizierung jedoch nicht allein auf Basis des LC-ELISAs beruhen. Die Summe der Konzentration im LC-ELISAGramm war verschieden von der erhaltenen Konzentration bei Vermessung der gesamten Probe. Eine Beurteilung über die Güte

der chromatographischen Trennung oder Richtigkeit der Quantifizierung auf Basis eines Vergleichs der beiden erhaltenen Konzentrationsergebnisse von klassischem ELISA und LC-ELISA ohne Gebrauch einer Referenzmethode ist daher nicht zweifelsfrei möglich.

2.1.6 Hochaufgelöste LC-ELISAs

Ein wichtiger Parameter hinsichtlich der Identifikation von Matrixeffekten ist eine ausreichend gute Separation der Stoffe. In diesem Abschnitt werden dazu zwei Ansätze vorgestellt. Ein Beispiel zeigt die Auswirkungen, wenn das Fraktionierungsintervall maximal verkleinert wird. Ein anderes die Ergebnisse einer zweidimensionalen chromatographischen Trennung.

Bei der Sammlung von 70 Fraktionen pro Platte ist das zu vermessende Zeitfenster limitiert. Eine Separation kann auch auf mehrere Platten verteilt werden, was aber zu einer Multiplikation der benötigten Zeit und Kosten führt. Das Ziel sollte es stets sein, eine komplette Separation auf einer Platte abzubilden. Je kürzer das Fraktionierungsintervall gewählt wird, desto kürzer ist das zu vermessende Zeitfenster bzw. desto höher ist die Anzahl notwendiger Fraktionen. Es stellte sich die Frage, ob eine höhere zeitliche Auflösung auch zu einer größeren Aussagekraft führt und den Mehraufwand rechtfertigt. In Abbildung 13 sind die erhaltenen LC-ELISAGramme einer Klärwerksablaufprobe gezeigt, welche mit einem Fraktionierungsintervall von 9 s bzw. 3 s vermessen wurde.

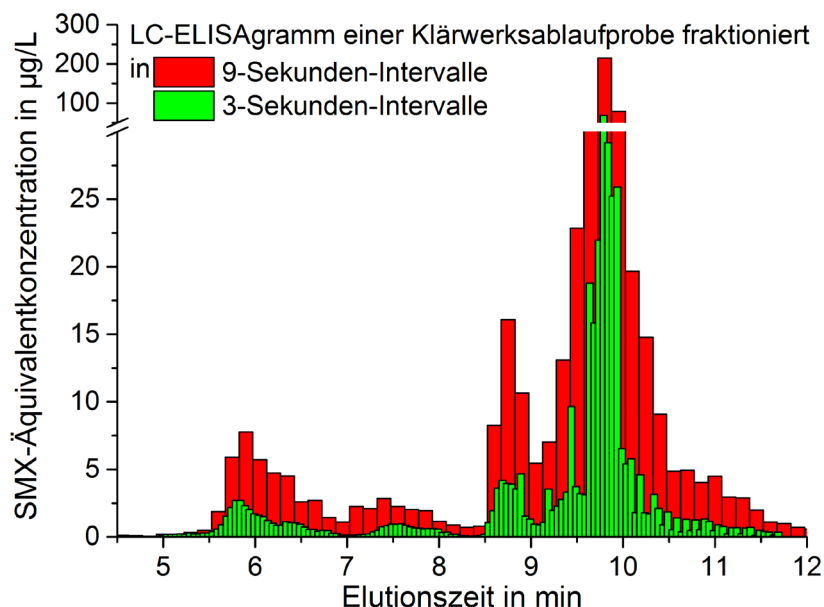


Abbildung 13: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen für Klärwerksablauf 1 mit einem Fraktionierungsintervall von 9 Sekunden und 3 Sekunden unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Bei Anwendung des kürzeren Fraktionierungsintervalls werden die Signale besser aufgelöst. Zusätzliche signifikante Signale, welche zuvor überlagert wurden, sind jedoch nicht erkennbar. Zur Aufnahme des LC-ELISAGramms mit einem 9-Sekunden-Intervall wurde eine Platte benötigt, für das 3-Sekunden-Intervall-ELISAGramm waren 3 Platten und dreimal mehr Zeit notwendig. Der Mehraufwand kann mit der höheren Auflösung nicht gerechtfertigt werden, so dass ein 9-Sekunden-Intervall als ausreichend bewertet wurde. Eine Auflösung von 3 Sekunden entspricht der höchsten gerätespezifischen zeitlichen Auflösung und, im Falle der für die Trennung gewählten HPLC-Methode, 1-2 Tropfen Eluat pro Fraktion. Eine höhere Auflösung wäre technisch mit dem verwendeten Gerät nicht möglich. Da das gesammelte Volumen bei kürzeren Fraktionierungsintervallen auch kleiner ist, erfolgt eine stärkere Verdünnung bzw. stärkere Verteilung des Analyten. Die Konzentration an Analyt nimmt in der einzelnen Fraktion ab, was nicht unbeachtet bleiben darf. Kürzere Zeitintervalle könnten aber bei Anwendung der UHPLC, bei der deutlich schmalere Signale erhalten werden, zwingend erforderlich werden. Innerhalb dieser Arbeit wurden hauptsächlich chromatographische Trennungen durchgeführt, welche 22 min dauerten, wovon 21 min durch 70 Fraktionen mit einem Fraktionierungsintervall von 18 s erfasst wurden. Traten signifikante Signale in einem Zeitfenster von nur 10,5 min auf, wurde ein Intervall von 9 s gewählt.

Eine andere Möglichkeit, um die Auflösung deutlich zu erhöhen, bei gleichzeitigem Erhalt der Quantifizierbarkeit, ist die offline 2D-Chromatographie. Dabei wird eine Probe nicht nur einmal chromatographisch aufgetrennt, sondern eine Fraktion gesammelt und die Inhaltsstoffe erneut mit einer anderen chromatographischen Trennung voneinander separiert. Idealerweise sollten sich die beiden chromatographischen Methoden deutlich voneinander unterscheiden, was auch beachtet wurde. In der ersten chromatographischen Dimension wurde ein Gradient aus Wasser und MeOH mit 0,1 % AcOH und 10 mM NH_4Ac bei Verwendung einer stationären C_{18} -Phase, einer Säulentemperatur von 50 °C und einer Flussrate von 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ benutzt. Für die zweite Dimension wurden alle Parameter verändert. Es wurde eine Phenyl-Phase, ein anderer Gradient aus Wasser und ACN, eine Flussrate von 700 $\mu\text{L}/\text{min}$ und eine Säulentemperatur von 40 °C angewendet. Die unter Anwendung der ersten HPLC-Methode erhaltene Fraktion im Zeitfenster von 9-12,5 min wurde mittels der zweiten orthogonalen HPLC-Methode separiert und ein LC-ELISAGramm aufgenommen, welches in Abbildung 14 dargestellt ist.

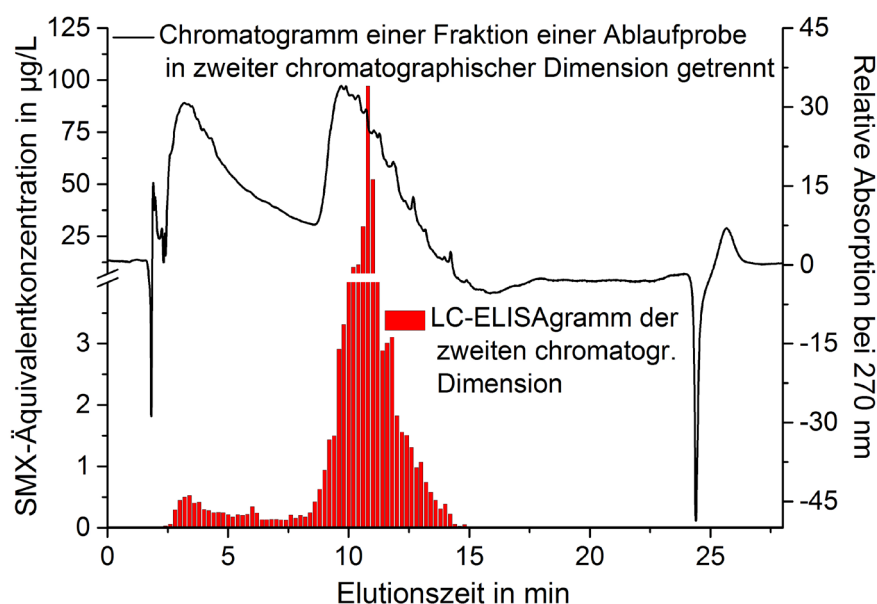


Abbildung 14: SMX-LC-ELISAGramm und UV-Chromatogramm, gemessen bei Anwendung von HPLC-Methode 3 für die Fraktion 9-12,5 min, welche bei Fraktionierung der Ablaufprobe 1 unter Anwendung der HPLC-Methode 1 erhalten wurde.

Die Fraktion die in der ersten chromatographischen Dimension durch ein Zeitfenster von 3,5 min repräsentiert wurde, wurde in der zweiten Dimension auf über 12 min aufgetrennt. Wie im UV-Chromatogramm und LC-ELISAGramm zu sehen, gab es zwei Bereiche in denen vermutlich die meisten Stoffe eluierten. Der erste Bereich ist um die Elutionszeit von 3 min und der zweite um 11 min. Man beachte die Achsenunterbrechung der y-Achse und deren unterschiedliche Skalierung. Im Grunde gab es nur ein deutliches Signal im SMX-LC-ELISAGramm bei 10,8 min, welches sehr gut mit der Elutionszeit eines vermessenen N^4 -Acetyl-SMX-Standards übereinstimmte. Neben der Elutionszeit wurde auch dessen Signalbreite von 48 s bei einem Fraktionierungsintervall von 12 s durch 4 Fraktionen gut wiedergegeben. N^4 -Acetyl-SMX, der Hauptmetabolit von SMX, zeigte in der ersten Trenndimension eine Elutionszeit von etwa 10 min und müsste daher, bei Anwesenheit in der Probe, in der zweiten Trenndimension vorhanden sein. Das Vorhandensein von N^4 -Acetyl-SMX konnte mittels LC-MS/MS unter Anwendung eines Referenzstandards nachgewiesen werden.

Es wurde die zeitliche Auflösung des LC-ELISAGramms bis hin zum gerätspezifischen Maximum von 3 s gesteigert, welches ein Fraktionierungsintervall von 1-2 Tropfen Eluat darstellt. Es zeigte sich, dass eine Auflösungssteigerung zu geringeren Analytkonzentrationen in den Fraktionen sowie einem erhöhten Arbeits-, Zeit- und Kostenaufwand führte, welche den geringen zusätzlichen Informationsgewinn nicht rechtfertigte. Durch Anwendung einer zweiten orthogonalen chromatographischen Trenndimension konnte die Auflösung ebenfalls gesteigert

werden. Es wurde in der Ablaufprobe 1 *N*⁴-Acetyl-SMX, ein Metabolit des Sulfamethoxazols mit einer Kreuzreaktivität von etwa 600 %, indirekt mittels LC-LC-ELISA und sicher mittels LC-MS/MS nachgewiesen. Die Verwendung zweier unterschiedlicher chromatographischen Trenndimensionen reicht nach der Richtlinie 2002/657/EG aus, um mittels LC-Immunogramm einen Stoff zu identifizieren, sofern weitere in Abschnitt 1.5 genannte Randbedingungen erfüllt sind. Anders als hier präsentiert sollte die aus der ersten Trenndimension verwendete zeitliche Fraktionsbreite aber deutlich kleiner sein und idealerweise nur das Signalmaximum umfassen. Dadurch kann die Chance einer Interferenz für die zweite Trenndimension deutlich minimiert werden. Dies wurde an dieser Stelle nicht durchgeführt, da nicht die Identifikation von *N*⁴-Acetyl-SMX, sondern lediglich eine bessere Auflösung des breiten Signals von 9-12,5 min das Ziel war.

2.2 Anwendung des LC-ELISAs zur Identifizierung von Interferenzen bei der Vermessung von Umweltproben

Nachdem die Ergebnisse zur Validierung des LC-ELISAs vorgestellt und die Anwendbarkeit gezeigt wurde, sollen nun die bei Vermessung der Umweltproben erhaltenen LC-ELISAGramme vorgestellt werden. Es wurde unter Anderem der Einfluss der Probenaufbereitung auf die LC-ELISAGramme untersucht. Aufbauend auf den LC-ELISAGrammen lassen sich effektiver und gezielter als beim klassischen ELISA Strategien entwickeln, um Interferenzen zu eliminieren.

2.2.1 Einfluss der Anreicherungsart der Probe

Aufgrund der niedrigen Analytkonzentrationen bzw. nicht ausreichend hohen Nachweisempfindlichkeit der verwendeten SMX- und E1-ELISAs, war eine Probenanreicherung notwendig. Typischerweise ist neben der Anreicherung der Probe auch die Eliminierung störender Begleitstoffe („clean-up“) ein Ziel der Probenanreicherung mittels Festphasenextraktion (SPE). Da in der vorliegenden Arbeit die Motivation in der Untersuchung und Identifikation von Matrixeffekten bestand, wäre jedoch ein möglichst geringer Verlust von Interferenzen durch die Probenanreicherung wünschenswert. Die Probenanreicherung erfolgte mittels SPE, wobei unterschiedliche SPE-Kartuschen getestet wurden. In Voruntersuchungen wurden Reinstwasserproben mit Analyt dotiert und die Wiederfindungen des Analyten bestimmt, um für die Anreicherung der Analyten aus den Umweltproben zweckmäßige SPE-Kartuschen zu ermitteln. Für die Anreicherung aus Reinstwasser wurde für SMX eine Absolutmenge von etwa 1000 ng und für Estron etwa 100 ng

verwendet. Dies entspricht etwa der 10-fachen Menge Analyt der bei Anreicherung der Realproben zu erwarten ist. Diese erhöhte Analytmenge wurde gewählt, um mögliche spätere Störungen durch Besetzungen von Adsorptionsstellen durch Matrixbestandteile zu simulieren. Die Wiederfindung von SMX und E1 ist abhängig von der verwendeten SPE-Kartusche und der Matrix, aus der extrahiert wurde, wie in Tabelle 6 gezeigt.

Tabelle 6: *Durchschnittliche Wiederfindungsraten in % von Sulfamethoxazol bzw. Estron bei Anwendung verschiedener Festphasenextraktionskartuschen (alle 500 mg Sorbensmaterial) zur Anreicherung aus verschiedenen Matrices mit unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren*

Kartusche	Matrix (Anreicherungsfaktor)		
	Reinstwasser (1000-fach)	Klärwerkszulauf (100-fach)	Klärwerksablauf (500-fach)
<i>Sulfamethoxazol</i>			
Strata-X	104 ± 3	85 ± 3	92 ± 5
Oasis HLB	101 ± 3	86 ± 3	81 ± 5
CHROMABOND ABC 18	94 ± 2	7 ± 1	3 ± 2
Bakerbond (RP-C18)	93 ± 2	14 ± 3	9 ± 4
<i>Estron</i>			
Bakerbond (RP-C18)	99 ± 5	93 ± 5	92 ± 6
Strata-X	98 ± 4	82 ± 6	94 ± 7

Man erkennt an den Wiederfindungsergebnissen von SMX, dass die Bestimmung einer Wiederfindung aus Reinstwasser keine Aussage über die Wiederfindung des Analyten aus Realproben zulässt. Die SPE-Kartuschen CHROMABOND ABC 18 und Bakerbond (RP-C18) liefern für SMX in Reinstwasser akzeptable Wiederfindungen, wenn auch keine Wiederfindungsrate von 100 %. Für Abwasserproben, bei denen zur Bestimmung der Wiederfindung als Referenz ein Isotopenstandard eingesetzt wurde, lagen die Wiederfindungen jedoch im inakzeptablen Prozentbereich. Lediglich die Kartuschen Strata-X und Oasis HLB lieferten noch akzeptable Wiederfindungen von im Mittel über 80 %.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Estron aus dotierten Reinstwasserproben wurden insgesamt 10 verschiedene SPE-Kartuschen getestet. Für die 8 Kartuschen, welche in Tabelle 6 nicht aufgeführt sind, betrug die höchste Wiederfindung 86 ± 3 %. Unter Berücksichtigung der Erfahrung der verminderten Wiederfindung für SMX aus Realproben, wurden diese 8 Kartuschen jedoch nicht zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von Estron aus Abwasserproben getestet.

Zur Anreicherung von SMX aus Abwasserproben waren von den getesteten SPE-Kartuschen lediglich Oasis HLB und Strata-X zweckmäßig. Die unter

Verwendung dieser beiden Kartuschen erhaltenen SMX-LC-ELISAGramme waren sehr ähnlich, weshalb auf eine vergleichende Darstellung an dieser Stelle verzichtet wird. Die hohe Ähnlichkeit ist nicht überraschend, weil die für diese beiden Kartuschen verarbeiteten Sorbensphasen ebenfalls sehr ähnlich sind. Beide Phasen sind Polymerphasen, welche formal mit 2-Pyrrolidon funktionalisiert sind und sich nur leicht in ihrer Form des Polystyrolderivats als Rückgrat unterscheiden. Es werden daher zu den adsorbierenden Stoffen sehr ähnliche Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe und π - π -Wechselwirkungen ausgebildet. Zur Anreicherung der Proben, welche als SMX-LC-ELISAGramm dargestellt sind, wurden ausschließlich Strata-X-Kartuschen verwendet.

Die beiden SPE-Phasen welche zur Anreicherung von Estron geeignet waren, unterscheiden sich jedoch deutlich. Dabei handelt es sich erneut um Strata-X und zum anderen um Bakerbond RP-C18, eine endcapped Kieselgelphase, an welche Octadecyl-Ketten geknüpft sind. Für diese beiden Sorbensphasen können deutliche Unterschiede, im Hinblick auf adsorbierte Stoffe und damit LC-ELISAGramme, erwartet werden. Ein Vergleich der erhaltenen E1-LC-ELISAGramme für angereicherte Oberflächenwasserproben ist in Abbildung 15 gezeigt.

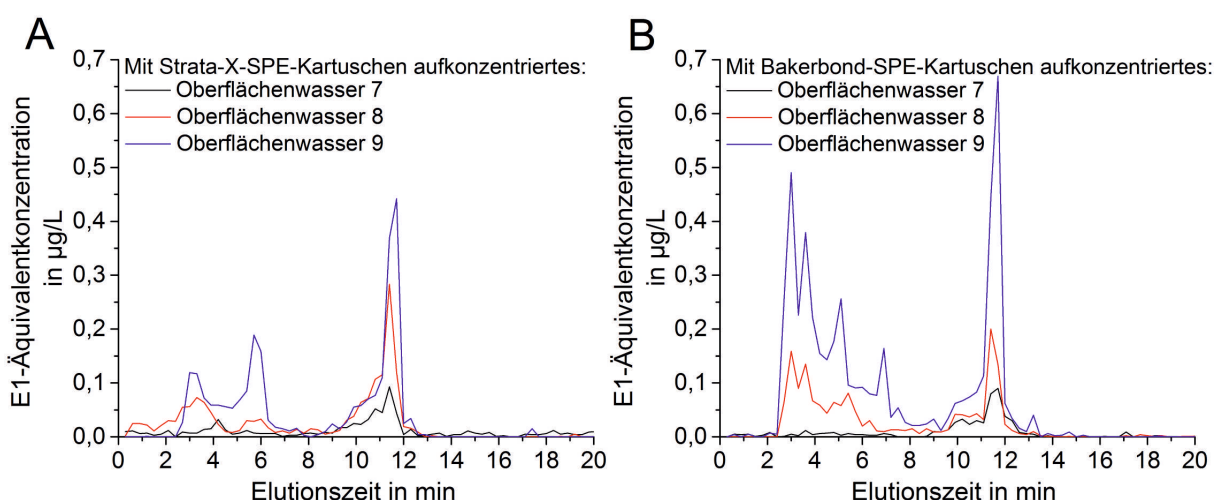


Abbildung 15: *E1-LC-ELISAGramme von Teltowkanalproben, erhalten nach 200-facher Anreicherung mit (A) Strata-X- und (B) Bakerbond (RP-C18)-Kartuschen unter Verwendung der HPLC-Methode 2.*

Bei den Proben handelt es sich um Wasser aus dem Teltowkanal, wobei der Anteil an eingeleitetem Abwasser von Oberflächenwasser 7 zu 9 zunimmt. Diese Zunahme ist zum einen am Anstieg der Signalintensität des E1-Signals bei 11,7 min und zum anderen am Anstieg der Signalintensität von Interferenzsignalen zu erkennen. Die E1-Konzentration im LC-ELISAGramm lag für Oberflächenwasser 9 bei Verwendung

der Bakerbond-Kartusche etwas höher, was zum einen an der im Mittel leicht besseren Wiederfindung von Estron im Vergleich zur Strata-X-Kartusche (Tabelle 6) und zum anderen an der Messunsicherheit liegen kann. Wesentlicher ist jedoch, dass sich die LC-ELISAGramme bei Verwendung der beiden deutlich unterschiedlichen Sorbensphasen auch wie erwartet deutlich unterscheiden. Beide LC-ELISAGramme (Abbildung 15 A und B) zeigen für Oberflächenwasser 9 ein Signal um 3 min, 5,5 min und ein breites Signal um 10 min. Bei Verwendung der Bakerbond-Kartusche treten jedoch zusätzliche Signale bei 3,5 min und 7 min auf. Zudem ist das Interferenzsignal bei 3 min deutlich intensiver. Da alle Interferenzsignale mit steigendem Anteil an eingeleitetem Abwasser ansteigen beziehungsweise erst auftreten, kann angenommen werden, dass diese Interferenzen durch anthropogene und nicht durch natürliche Stoffe des Oberflächenwassers hervorgerufen werden.

Neben dem Einfluss der Art der Sorbensphase sollte auch der Einfluss der Verwendung einer Festphasenextraktion untersucht werden. Wünschenswert wäre, dass durch die SPE keine Interferenzsignale beseitigt werden und so die Chance besteht, möglichst viele natürlich auftretende interferierende Stoffe detektieren und identifizieren zu können. Dazu wurden Abwässer, welche unterschiedlich stark im Klärwerk Steinhäule behandelt wurden, zum einen mittels Strata-X-Kartuschen und zum anderen im 30 °C warmen Wasserbad mittels Evaporation durch Druckluft angereichert. Ein Vergleich der erhaltenen LC-ELISAGramme ist in Abbildung 16 dargestellt.

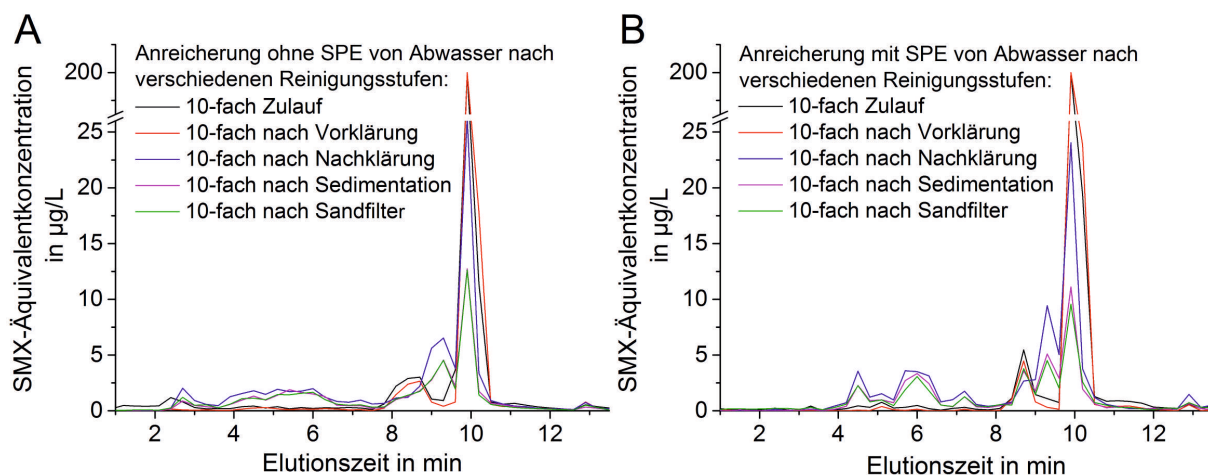


Abbildung 16: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule, erhalten bei 10-facher Anreicherung (A) ohne SPE im Druckluftstrom und (B) mit Strata-X-Kartuschen, unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Die erhaltenen SMX-LC-ELISAGramme unter Verwendung von SPE-Anreicherung und Aufkonzentrierung ohne SPE sind im Hinblick auf das Vorhandensein von Interferenzsignalen sehr ähnlich. Lediglich die Signalformen sind stark verschieden. Um im LC-ELISAGramm eine 10-fache Anreicherung zu erhalten, müssen die Proben zuvor 50-fach angereichert werden. Wenn die Proben im Gasstrom eingeeengt werden bleiben nahezu alle Inhaltsstoffe entsprechend angereichert erhalten. Die Signale, unter Verwendung dieser Anreicherungsart, sind sehr breit und verschmieren. Der Grund dafür wird höchstwahrscheinlich der relativ hohe Fettgehalt in den Proben sein, welcher die Trennung erschwert und zur Signalverbreiterung führt. Dass schon geringe Fettgehalte in den Proben, bei der hier verwendeten analytischen HPLC-Säule (C₁₈-Phase), zur Signalverbreiterung führen, konnte schon in früheren Messungen von Milchproben beobachtet werden. Eine Verbreiterung der Signale ist auch für die erhaltenen UV-Chromatogramme (Abbildung 17) zu erkennen. Ungeachtet der Signalverbreiterung sind die erhaltenen LC-ELISAGramme für Abbildung 16 A und B sehr ähnlich, lediglich ein sehr kleines zusätzliches Signal bei 2,5 min ist bei Vermeidung der SPE detektierbar. Für den Zulauf und nach der Vorklärung ist ein Signal bei 8,7 min und 10 min zu erkennen. Das Signal bei 8,7 min kann SMX zugeordnet werden und bei einer Elutionszeit von 10 min konnte N⁴-Acetyl-SMX nachgewiesen werden. Nach der Nachklärung treten zusätzliche Signale um 4,5 min, 6 min, 7 min und 9,5 min auf. Die Signalintensität der Interferenz bei 10 min nimmt hingegen deutlich und die Signalintensität des SMX-Signals leicht ab. Durch Anwendung der Sedimentation als Abwasserbehandlungsstufe können die Signale bei 10 min und 9,5 min abgesenkt werden.

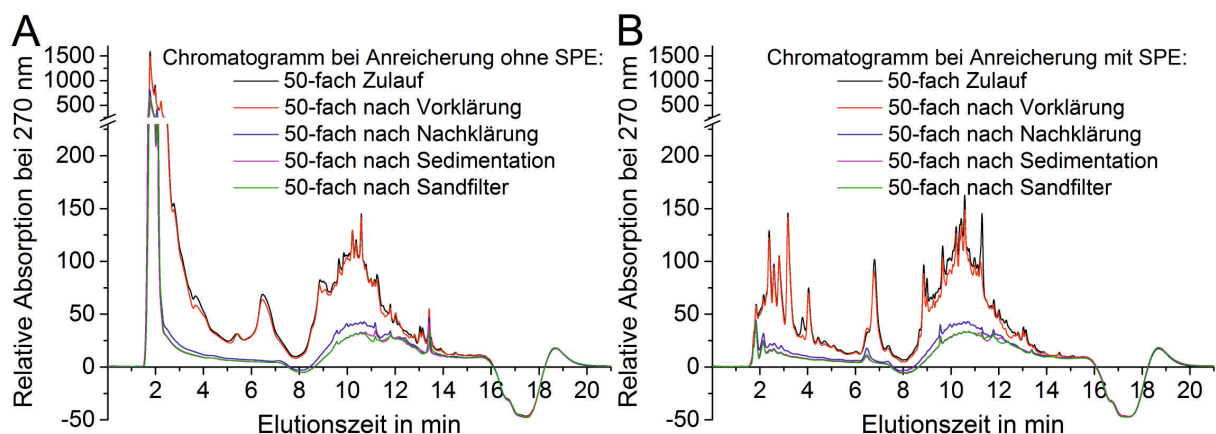


Abbildung 17: Überlagerung von UV-Chromatogrammen von Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule, erhalten nach 50-facher Anreicherung (A) ohne SPE im Druckluftstrom und (B) mit Strata-X-Kartuschen, unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Wie bereits an den LC-ELISAGrammen zu erkennen, sind auch die Signale der UV-Chromatogramme nach Anwendung der SPE deutlich schmaler. Bemerkenswert ist, dass die Extinktion bei 270 nm und das Profil der Signale trotz Anwendung der SPE sehr ähnlich zu dem ohne SPE ist. Durch Gebrauch der Strata-X-Kartuschen wird die Probe folglich in der Zusammensetzung der Stoffe, die im SMX-LC-ELISA ein Signal liefern und die bei 270 nm absorbieren, kaum verändert. Lediglich das sehr intensive Signal um 2 min, man beachte dabei die Achsenunterbrechung und unterschiedliche Skalierung, wird durch Gebrauch der Strata-X-Kartuschen stark reduziert. Da die Elutionszeit von 2 min nahe der Totzeit des Systems ist, wird es sich vermutlich um sehr polare Stoffe wie Zuckerverbindungen handeln, welche kaum an der C₁₈-Phase der analytischen Säule adsorbieren. Obwohl das Signal bei 2 min im UV-Chromatogramm sehr intensiv ist und wahrscheinlich eine große Anzahl an Stoffen repräsentiert, kann nur ein sehr schwaches Interferenzsignal zu dieser Elutionszeit im SMX-LC-ELISA detektiert werden. Dies zeigt indirekt die gute Selektivität der anti-SMX Antikörper.

Anhand von Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule wurde der Einfluss einer Festphasenextraktion auf das SMX-LC-ELISAGramm getestet. Bei Vermeidung der SPE wurde eine deutliche Signalverbreiterung der Signale im LC-ELISAGramm und im UV-Chromatogramm erhalten, welche vermutlich auf Fette zurückzuführen ist. Unabhängig davon, ob die Probe mit oder ohne SPE angereichert wurde, waren die Signalintensitäten und das Profil der Signale im UV-Chromatogramm wie auch im LC-ELISAGramm, bis auf ein Signal um 2 min, sehr ähnlich. Dies zeigt, dass durch Anreicherung der Probe mittels Strata-X-Kartusche, für die hier untersuchten Proben, keine wesentlichen Interferenzsignale eliminiert wurden. Dies ist im Hinblick auf die Detektion und Identifikation neuer Interferenzen wünschenswert. Eine Anreicherung über SPE konnte semi-automatisiert erfolgen. Sie ermöglichte eine schnelle und einfache Anreicherung auch für hohe Anreicherungs faktoren. Die mittels SPE angereicherten Proben lieferten schmalere Signale in den UV-Chromatogrammen und LC-ELISAGrammen, weshalb eine Anreicherung über SPE der Anreicherung im Gasstrom eindeutig vorzuziehen ist. Nicht unerwähnt soll jedoch die Tatsache bleiben, dass die verwendeten SPE-Kartuschen mit rund 8 € pro Kartusche eine finanzielle Mehrbelastung darstellen. Für die Anreicherung von Estron zeigten zwei deutlich verschiedene Sorbensphasen eine gute Wiederfindung. Bei einer Kartusche handelt es sich um eine funktionalisierte Polymerphase und bei der anderen um ein Kieselgel an welches Octadecyl-Ketten geknüpft waren. Die erhaltenen E1-LC-ELISAGramme zeigten für die über unterschiedliche Sorbensphasen angereicherten Oberflächenwasserproben unterschiedliche Profile. Dabei wurden mehr Interferenzsignale bei Anwendung der C₁₈-Phase erhalten. Eine allgemeine Schlussfolgerung, dass die Polymerphase besser zur Anreicherung geeignet sei,

kann jedoch nicht getroffen werden. Für Klärwerkszulauf und -ablaufproben ergaben sich für die beiden Phasen in den E1-LC-ELISAGrammen keine deutlichen Unterschiede.

2.2.2 Interferenzprofil von Umweltproben

In den bisherigen Abschnitten wurden schon ausgewählte LC-ELISAGramme, welche bei der Vermessung von Umweltproben erhalten wurden, gezeigt. In diesem Kapitel werden weitere Ergebnisse vorgestellt. In Abbildung 16 B sind LC-ELISAGramme aufgeführt, die die Resultate der Klärwerksproben des Klärwerks Steinhäule zeigen. Mit diesen Proben wurde der Einfluss von Reinigungsstufen auf das SMX-LC-ELISAGramm getestet. In der folgenden Abbildung 18 wird der Einfluss des Klärwerks deutlich. Dargestellt sind die SMX-LC-ELISAGramme von Zulauf und Ablauf der 6 Berliner Klärwerke. Für die Zulaufproben wurde eine 10-fache Anreicherung und für die Abläufe eine 20-fache Anreicherung genutzt. Diese Anreicherungsfaktoren wurden gewählt, um eine möglichst niedrige Anreicherung anzuwenden, welche jedoch auch für schwächer mit SMX belastete Proben eine SMX-Konzentration im gut quantifizierbaren Konzentrationsbereich liefert. Man beachte bei Abbildung 18 A und B die y-Achsenunterbrechung. SMX-Äquivalentkonzentrationen oberhalb der Achsenunterbrechung liegen außerhalb des gut quantifizierbaren Bereichs und sollten eher als Schätzung betrachtet werden.

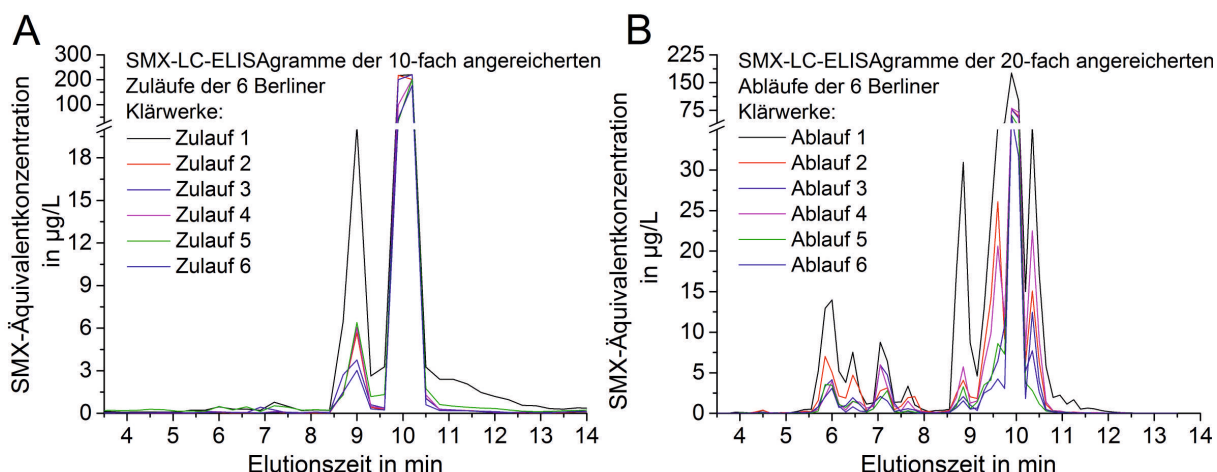


Abbildung 18: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen der (A) 10-fach angereicherten Zulaufproben und (B) 20-fach angereicherte Ablaufproben der 6 Berliner Klärwerke unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Auffällig ist, dass für die Proben aller 6 Berliner Klärwerke ein sehr ähnliches LC-ELISAGramm erhalten wurde. Es unterschied sich lediglich in den Signalintensitäten der Signale. Für die Zuläufe wurde, wie auch beim Klärwerk

Steinhäule, nur ein Signal um 9 min und um 10 min detektiert. Bei dem Signal um 9 min handelt es sich um SMX und das Signal um 10 min wird unter anderem von N^4 -Acetyl-SMX repräsentiert, wie mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden konnte. In den Abläufen traten zusätzliche Signale bei ca. 6 min, 6,5 min, 7 min, 8 min, 9,5 min und 10,5 min auf. Interferenzsignale bei 6 min, 7 min und 9,5 min konnten auch im Ablauf des Klärwerks Steinhäule gemessen werden. Es scheint, dass die Variation an möglichen interferierenden Stoffen, wie das Auftreten von Kreuzreaktanden oder verschiedene Stoffe, die unspezifisch binden, in ähnlicher Matrix nicht so groß ist wie man erwarten könnte. Jedoch kann die Intensität einer Interferenz auch für sehr ähnliche Matrices sehr stark variieren. In Abbildung 19 sind die SMX-LC-ELISAGramme für Berliner Oberflächenwasserproben gezeigt, welche durch Klärwerksabläufe beeinflusst sind.

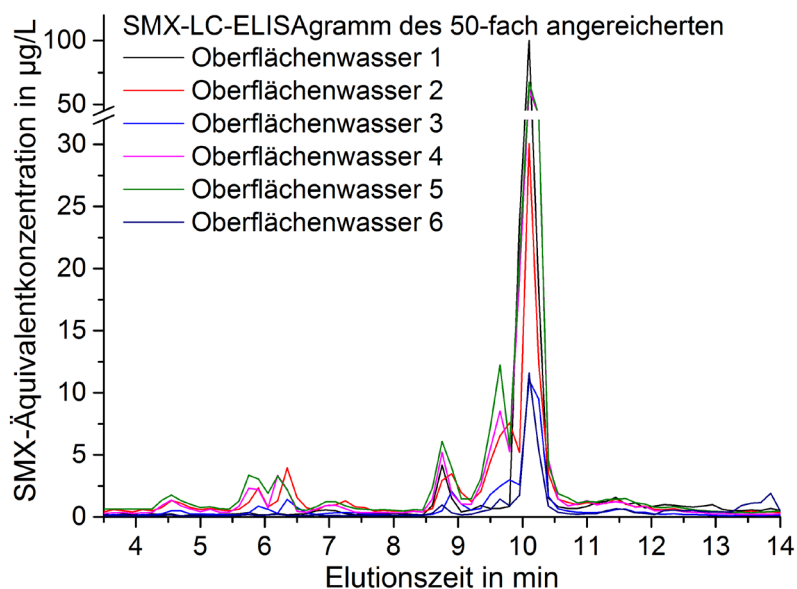


Abbildung 19: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen der 50-fach angereicherten Berliner Oberflächenwasserproben unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Die SMX-LC-ELISAGramme der Oberflächenwasserproben zeigten ein Profil, welches den Ergebnissen der Klärwerksablaufproben ähnlich war. Das Signal bei 10 min war jedoch relativ zum SMX-Signal etwas niedriger, wie auch die Signale um 6 min. Das Signal um 7 min war deutlich niedriger und das Signal bei um 8 min quasi nicht nachweisbar. Wie auch bei den Abwasserproben wurde der Anreicherungsfaktor so gewählt, dass die SMX-Konzentration im gut quantifizierbaren Bereich lag.

Die LC-ELISAGramme für die Abwasserproben bei Anwendung des anti-Estron Antikörpers sind in Abbildung 20 dargestellt. Da die E1-Konzentrationen in den Ablaufproben deutlich niedriger als in den Zulaufproben waren, wurde für die Abläufe ein deutlich höherer Anreicherungsfaktor gewählt. Wie für die SMX-LC-ELISA-

gramme zeigten auch die E1-LC-ELISAGramme der Ablaufproben, im Vergleich zu den Zulaufproben, mehr und relativ zum E1-Signal bei um 11,7 min intensivere Interferenzsignale. Dass für Ablaufproben höhere Überbestimmungen als für Zulaufproben erhalten werden, wurde auch bei anderen Arbeiten beobachtet [34,21].

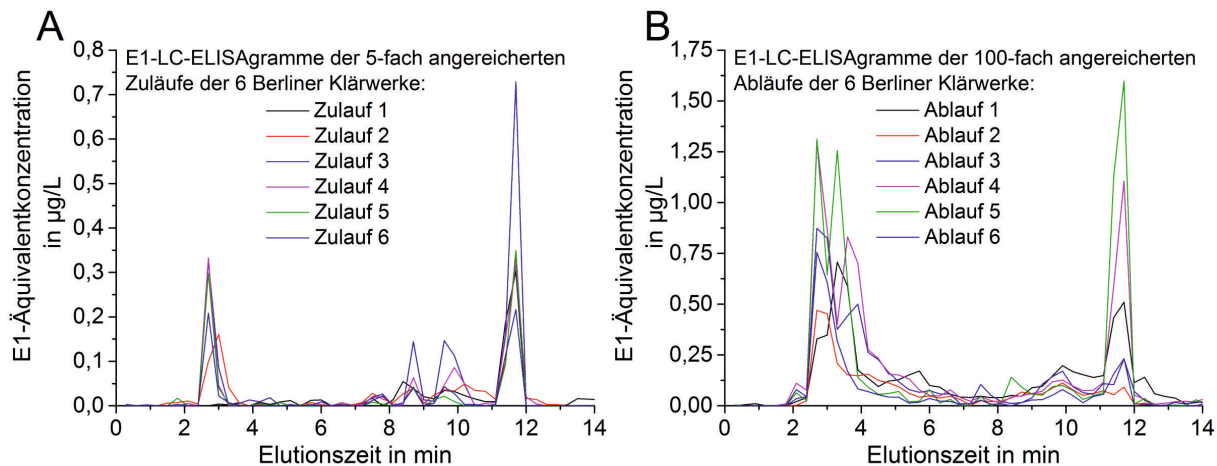


Abbildung 20: Überlagerung von E1-LC-ELISAGrammen der mittels Strata-X-Kartuschen (A) 5-fach angereicherten Zulaufproben und (B) 100-fach angereicherten Ablaufproben der 6 Berliner Klärwerke unter Verwendung der HPLC-Methode 2.

Die intensivsten Interferenzsignale wurden in den E1-LC-ELISAGrammen der Abwasserproben bei einer Elutionszeit von etwa 3 min erhalten. Dies deutet daraufhin, dass es sich wahrscheinlich um relativ polare Verbindungen handelt. Bei Verwendung des monoklonalen anti-E1 Antikörpers war das Estronsignal im LC-ELISAGramm für fast alle E1-LC-ELISAGramme eines der intensivsten Signale. In den SMX-LC-ELISAGrammen, welche mit dem polyklonalen anti-SMX Antikörper erhalten wurden, war das SMX-Signal stets ein relativ schwaches Signal im Vergleich zu dem intensivsten Interferenzsignal. Dieser eingeschränkte Vergleich deutet darauf hin, dass der Gebrauch von monoklonalen Antikörper zu weniger intensiven Interferenzsignalen führt. Diese These wird auch durch die Ergebnisse des monoklonalen anti-CBZ Antikörpers gestützt.

Die CBZ-LC-ELISAGramme für Proben aus dem Klärwerk Steinhäule zeigten, dass ein ELISA nicht immer durch Interferenzen beeinflusst sein muss. In den CBZ-LC-ELISAGrammen (Abbildung 21) war nur ein signifikantes Signal bei etwa 15,5 min zu sehen, welches Carbamazepin zuzuordnen ist.

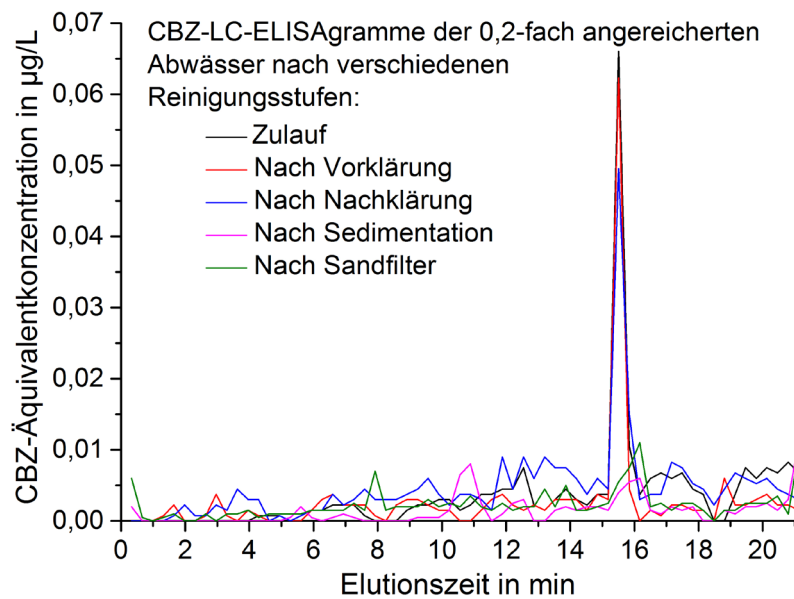


Abbildung 21: Überlagerung von CBZ-LC-ELISAGrammen von nicht angereicherten Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule unter Verwendung der HPLC-Methode 4.

Der Nachweis, dass es sich bei dem Signal um CBZ handelt, erfolgte mittels Referenzstandard und LC-MS/MS-Messung. Der durch den LC-ELISA quantifizierte Gehalt stimmte in guter Näherung mit den LC-MS/MS-Ergebnissen von etwa 250 ng/L überein. Aufgrund der guten Nachweisempfindlichkeit des CBZ-ELISAs mussten die Proben nicht angereichert werden und konnten, nach Abtrennung von Schwebstoffen, direkt vermessen werden.

Für die Zulaufprobe und nach der Vorklärung, was einer mechanischen Reinigung entspricht, wurden wie auch für SMX quasi identische Signalintensitäten erhalten. Durch die Nachklärung, einer biologischen Reinigung, wird die CBZ-Konzentration um etwa 20 % gesenkt. Nach dieser Reinigungsstufe sind in den SMX-LC-ELISAGrammen zusätzliche Signale messbar, die auch noch in den Abläufen nachweisbar sind. Um die Konzentration von Spurenstoffen stärker zu reduzieren, wird im Schritt der Sedimentation Pulveraktivkohle eingesetzt. An dieser sollen unerwünschte Stoffe adsorbieren. Im Falle der SMX-LC-ELISAGramme ist dabei eine Absenkung der Intensität der Interferenzsignale bei 10 min und 9,5 min auf etwa die Hälfte messbar. Das Signal bei 4,5 min, 6 min, 7 min und für SMX bei um 9 min bleibt jedoch nahezu unverändert intensiv. Im Falle von CBZ sinkt die Konzentration unterhalb der Signifikanzgrenze. Mittels LC-MS/MS wurde gemessen, dass die CBZ-Konzentration im Abwasser durch Einsatz der Sedimentationsstufe um etwa 90 % gesenkt wurde, was in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen Daten steht [89]. Eine Absenkung um etwa 90 % würde im CBZ-LC-ELISAGramm in

einer Konzentration von 0,005 µg/L resultieren, welche auch unterhalb der Signifikanzgrenze liegt.

In der Literatur wird häufig die Gruppe der Huminsäuren als ein Grund für Überbestimmung benannt. Dessen Einfluss auf die verwendeten ELISAs wurde ebenfalls getestet. Dafür wurde ein Huminsäurestandard aus dem Suwannee River und natürliches organisches Material (NOM) aus einem See verwendet. Bei dem NOM handelte es sich um einen Feststoff mit einem Huminsäureanteil von etwa 30 Gew.-%. Es zeigte sich, dass der Standard und das NOM bei natürlich vorkommenden Konzentrationen von 10 mg/L [90] zu einer signifikanten Überbestimmung führen könnten. Da die Proben jedoch mittels SPE angereichert wurden, wurde die Wiederfindung des NOMs bei Anwendung der Strata-X-Kartusche ermittelt. Es ergab sich eine Wiederfindung von etwa 1 %. Die Elutionszeit der meisten Stoffe des NOMs lag, bei Verwendung der HPLC-Methode 1 und gemessen am Totalionenstrom, im Bereich von 4-5 min. Die Wiederfindung des NOM wurde durch Integration des Ionenstroms bei Anwendung von LC-MS in diesem Elutionszeitbereich ermittelt. Zu einer Elutionszeit von 4-5 min konnten jedoch für über SPE angereicherte und nicht über SPE angereicherte Proben keine oder nur wenig intensive Interferenzsignale im SMX-LC-ELISAGramm erhalten werden. Der kommerziell erhältliche Huminsäurestandard mit Huminsäuren aus dem Suwannee River lieferte bei Verwendung der HPLC-Methode 2 ein Signal bei einer Elutionszeit von 2,1 min im E1-LC-ELISAGramm. Bei dieser Elutionszeit ist in den höher angereicherten Ablaufproben ein kleines Signal detektierbar. Dieses ist aber als vernachlässigbar einzuschätzen. Es kann jedoch, aufgrund der großen Diversität der Huminsäuren und NOM, nicht ausgeschlossen werden, dass die intensiven Signale bei 2,7 min im E1-LC-ELISAGramm eventuell unspezifisch bindenden Huminsäuren oder NOM zuzuordnen sind.

Die LC-ELISAGramme, die bei Vermessung der Umweltproben erhalten wurden, weisen für die Vermessung mit anti-SMX und anti-E1 Antikörper ein komplexeres Interferenzprofil für Klärwerksablaufproben als für Klärwerkszulaufproben auf. Die LC-ELISAGramme der 6 Berliner Klärwerke zeigten für Estron wie auch SMX ein sehr ähnliches Interferenzprofil, wobei die Signalintensitäten der Interferenzen stark variierten. Eine allgemeine Aussage fällt schwer, jedoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass es eine gewisse Korrelation zwischen Analytsignalintensität und Interferenzsignalintensität gibt. Treten besonders hohe oder niedrige Zielanalytkonzentrationen auf sind auch die Intensitäten der Interferenzen besonders hoch bzw. niedrig. Die CBZ-LC-ELISAGramme von Abwasserproben, die nicht angereichert werden mussten, weisen hingegen nur ein Signal auf, welches ausschließlich CBZ zuzuordnen war. Dieses Beispiel zeigt, dass nicht alle ELISAs

durch Interferenzen gestört sein müssen und eine direkte und richtige Quantifizierung mittels Immunoassay möglich ist. In der Literatur wird häufiger postuliert, dass monoklonale Antikörper selektiver seien und zu geringeren Überbestimmungen führen würden als polyklonale Antikörper [91,92]. Auch bei den in dieser Arbeit vorgestellten monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, wurden unter Verwendung der polyklonalen anti-SMX Antikörpern höhere Überbestimmungen bei der Direktmessung der Proben erhalten. Die E1-LC-ELISAGramme zeigten jedoch, dass auch eine Quantifizierung mittels monoklonalen Antikörpern durch unerwünschte Interferenzen deutlich gestört werden kann. Die in der Literatur häufig als ein Grund für Überbestimmungen aufgeführten Huminsäuren schienen nicht für wesentliche Interferenzsignale in den LC-ELISAGrammen verantwortlich zu sein.

2.2.3 Einfluss der sauren Hydrolyse der Probe

Nachfolgend werden Ansätze vorgestellt um Interferenzen gezielt zu eliminieren oder zu identifizieren. Da als Kreuzreaktand der SMX-Metabolit *N*⁴-Acetyl-SMX schon identifiziert und beschrieben wurde, sollte versucht werden, diesen gezielt zu entfernen. *N*⁴-Acetyl-SMX hat eine Kreuzreaktivität von etwa 600 % und liefert daher bei gleicher Konzentration wie SMX ein 6-fach stärkeres Interferenzsignal. Amide sind sehr stabile Verbindungen und können nur schwer hydrolysiert werden. Da SMX, als Sulfonamid, jedoch auch eine sehr stabile Verbindung ist, wurde versucht *N*⁴-Acetyl-SMX durch saure Hydrolyse in SMX zu überführen. Um die Reaktionsbedingungen so moderat wie möglich zu halten, wurde HCl einer *N*⁴-Acetyl-SMX-Lösung bei Raumtemperatur zugesetzt und die Proben nach Mischen stehen gelassen. Zur Verfolgung der Reaktion wurden die MRMs von SMX und *N*⁴-Acetyl-SMX mittels LC-MS/MS vermessen. Die Ergebnisse der jeweils intensitätsstärksten MRMs sind in Abbildung 22 dargestellt.

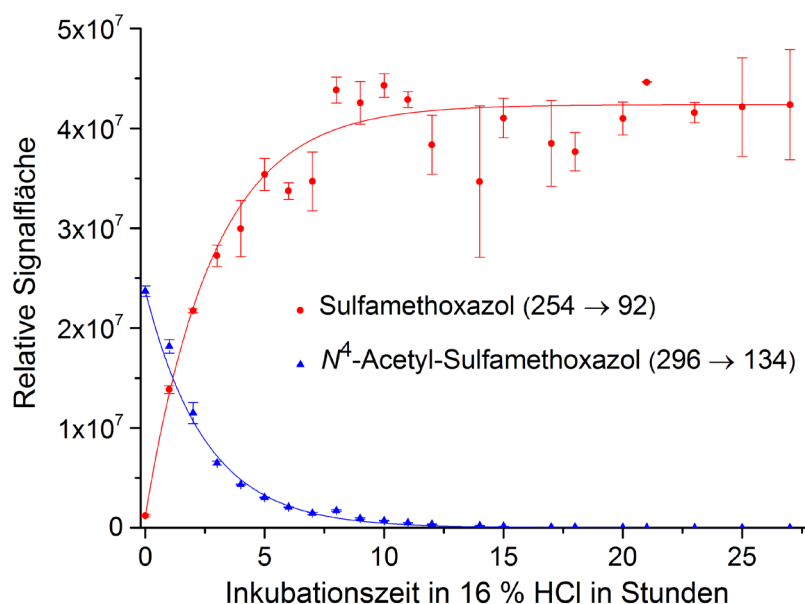


Abbildung 22: Gemessene Signalintensität des Massenübergangs 254 → 92 für SMX und 296 → 134 für *N*⁴-Acetyl-SMX bei Inkubation von *N*⁴-Acetyl-SMX in einer 16 %igen HCl-Lösung (mit 15 % MeOH) bei Raumtemperatur.

Als Lösungsmittel für die *N*⁴-Acetyl-SMX-Lösung wurde Reinstwasser mit 30 % MeOH verwendet, das auch für das Aufnehmen der trockenen Probenextrakte nach der SPE verwendet wurde. Als Konzentration der *N*⁴-Acetyl-SMX-Lösung wurden 70 µg/L gewählt, so dass sie ähnlich wie in den angereicherten Proben war. Zur Hydrolyse wurde das gleiche Volumen von *N*⁴-Acetyl-SMX-Lösung und 32 %ige HCl vereinigt. Die Bildung von SMX aus *N*⁴-Acetyl-SMX ist deutlich zu erkennen. Die Standardabweichungen der Doppelbestimmungen waren für manche Datenpunkte recht groß. Sie lagen aber im noch akzeptablen Bereich der allgemeinen Intensitätsschwankungen, welche aufgrund der ablaufenden Reaktion und Schwankungen der Ionisationsbedingungen zwischen den Messungen von Proben auftreten können. Eine Normierung zu einem Isotopenstandard war nicht möglich, da dieser der Probe, zur Verhinderung von Kontaminationen an SMX, nicht zugesetzt wurde. Nach etwa 10 h war keine signifikante Steigerung der SMX-Signalintensität mehr nachweisbar und die Signalintensität blieb über die nachfolgenden 17 h stabil. Dies zeigt auch die Stabilität von SMX unter diesen stark sauren Bedingungen. Nach 18 h war *N*⁴-Acetyl-SMX nicht mehr nachweisbar. Eine Zugabe von 32 %iger HCl zur Probe und Lagerung bei Raumtemperatur über Nacht reicht aus um den störenden Kreuzreaktanden *N*⁴-Acetyl-SMX zu eliminieren. Dabei wird der Zielanalyt SMX gebildet.

Da die höchsten Interferenzsignalintensitäten in den SMX-LC-ELISAGrammen für Zulauf und Ablauf des Klärwerks 1 erhalten wurden und die LC-ELISAGramme sich für alle Klärwerke sehr ähnelten, wurden nur Zulauf 1 und Ablauf 1 zum Versuch

einer Identifikation von Interferenzsignalen verwendet. Ein Vergleich von SMX-LC-ELISAGrammen von Zulauf 1 und Ablauf 1 mit und ohne saure Hydrolyse ist in Abbildung 23 gezeigt.

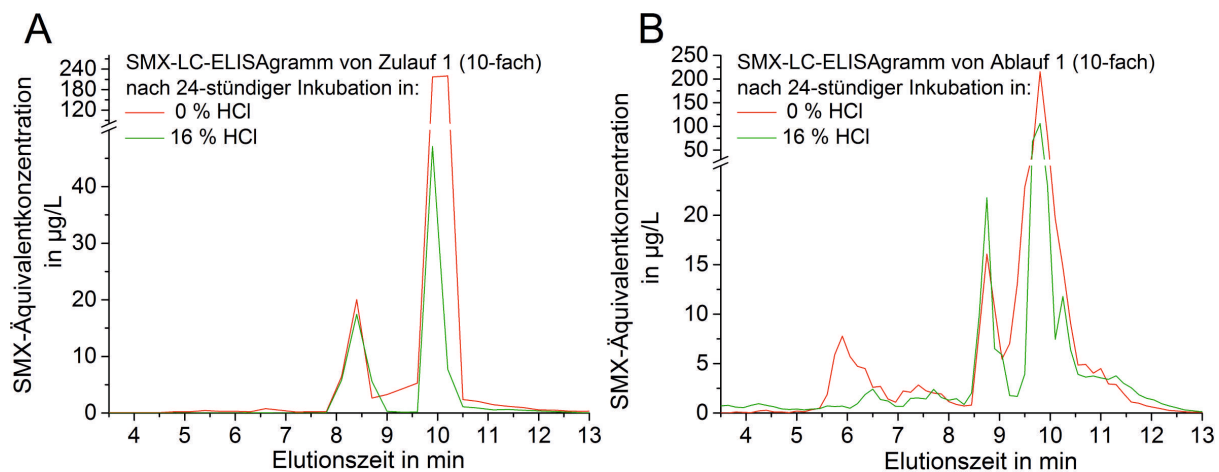


Abbildung 23: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von 10-fach angereicherten (A) Zulauf 1 und (B) Ablauf 1 nach 24-stündiger Inkubation mit und ohne HCl unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Nach saurer Hydrolyse war eine deutliche Reduktion des Signals um 10 min für Zulauf 1 zu erkennen. Diese Reduktion war zu erwarten, da N^4 -Acetyl-SMX, welches bei 10 min nachgewiesen werden konnte, abgebaut wird. Man beachte bei Abbildung 23 A und B die y-Achsenunterbrechung und unterschiedliche Skalierung. Das weitere Vorhandensein eines Signals bei 10 min zeigte jedoch, dass dieses Interferenzsignal nicht ausschließlich durch N^4 -Acetyl-SMX hervorgerufen wurde. Ein erwarteter Anstieg des SMX-Signals bei ca. 8,5 min blieb aus. Dies deutete daraufhin, dass durch die Probenmatrix eine Bildung von SMX unterbunden wurde. Diese These wird auch durch die LC-MS/MS-Ergebnisse in Tabelle 7 unterstützt. Bei Vermessung des Ablaufs 1 wurde durch die saure Hydrolyse eine geringere Reduktion des Signals bei 10 min detektiert, was aufgrund der geringeren N^4 -Acetyl-SMX-Konzentration im Ablauf nachvollziehbar ist. Die Signalintensität des SMX-Signals bei etwa 8,7 min stieg leicht an. Auffällig war, dass das Signal um 6 min im LC-ELISAGramm durch die saure Hydrolyse nahezu verschwand. Die übrigen Signale im LC-ELISAGramm veränderten sich kaum.

Tabelle 7: Mittels LC-MS/MS ermittelte Konzentration in ng/L von Sulfamethoxazol und *N*⁴-Acetyl-Sulfamethoxazol in Abwasserproben sowie die Umsatzrate der durch saure Hydrolyse (16 % HCl) umgesetzten Menge von *N*⁴-Acetyl-Sulfamethoxazol zu Sulfamethoxazol

Probe	Sulfamethoxazol	<i>N</i> ⁴ -Acetyl-Sulfamethoxazol	Sulfamethoxazol nach Hydrolyse	Umsatzrate der Hydrolyse in %
Zulauf 1	2650 ± 10	1003 ± 3	2520 ± 20	- 13
Zulauf 2	757 ± 7	2000 ± 70	1550 ± 30	40
Zulauf 6	330 ± 10	930 ± 10	657 ± 6	35
Ablauf 1	2230 ± 20	150 ± 20	2360 ± 60	87
Ablauf 2	232 ± 3	90 ± 10	410 ± 20	198
Ablauf 6	120 ± 0	122 ± 1	274 ± 9	126

Die Ergebnisse zeigen, dass wie in den LC-ELISAGramm für Zulauf 1 (Abbildung 23) zu sehen, nicht die bei vollständigem Umsatz von *N*⁴-Acetyl-SMX zu SMX, erwartete SMX-Konzentration erhalten wurde. Die Konzentration nahm sogar leicht ab. Dies deutet daraufhin, dass es in der komplexen Matrix von Zulauf 1 zu Nebenreaktionen kommen muss, welche sogar zu einer Eliminierung von SMX führen. Für Zulauf 2 und 6 konnte ein Anstieg der SMX-Konzentration gemessen werden. Es scheint, dass in diesen Matrices bei saurer Hydrolyse nicht so extreme Bedingungen wie in Zulauf 1 vorherrschten. Aber auch für Zulauf 2 und 6 wurde keine vollständige Umsetzung von *N*⁴-Acetyl-SMX zu SMX erhalten. Die Klärwerke 1, 2 und 6 wurden ausgewählt, da die Zuläufe und Abläufe sehr unterschiedliche Konzentrationen und Verhältnisse von SMX zu *N*⁴-Acetyl-SMX aufwiesen. In den Ablaufproben war die Konzentration an *N*⁴-Acetyl-SMX deutlich geringer als in den Zulaufproben. Überraschenderweise wurde nach der sauren Hydrolyse für die Ablaufproben eine SMX-Konzentration erhalten, welche abgesehen von Ablauf 1, oberhalb der durch vollständigen Umsatz von *N*⁴-Acetyl-SMX zu SMX erwarteten Konzentration lag. Dass die Umsatzrate bei Ablauf 1 niedriger war, kann indirekt erwartet werden, da auch bei Zulauf 1 eine deutlich geringere Umsatzrate erhalten wurde. Die erhöhte Umsatzrate von über 100 % für Ablauf 2 und 6, und unter Berücksichtigung der scheinbar reaktiveren Matrix bei Klärwerk 1 auch für Ablauf 1, deutete daraufhin, dass es eine weitere Quelle zur Bildung von SMX neben *N*⁴-Acetyl-SMX geben musste. Da im LC-ELISAGramm lediglich das Signal um 6 min reduziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass aus diesem Interferenzsignal SMX gebildet wurde.

Es zeigte sich, dass bei Behandlung der Fraktion um 6 min mit 16 %iger HCl schon nach einer Inkubationszeit von 1 min ein SMX-Signal mittels LC-MS/MS nachweisbar war, dessen Intensität sich durch längere Inkubationszeit aber nicht mehr signifikant änderte. Um eine mögliche Kontamination an SMX auszuschließen und um eine zusätzliche Information, wie kinetische Daten der Hydrolyse vergleichbar zu

Abbildung 22, zu erhalten, wurde die HCl-Konzentration auf 5 % abgesenkt. Die erhaltenen Signalintensitäten bei Inkubation der isolierten Fraktion von 5,8-6,1 min in 5 % HCl bei Raumtemperatur sind in Abbildung 24 gezeigt.

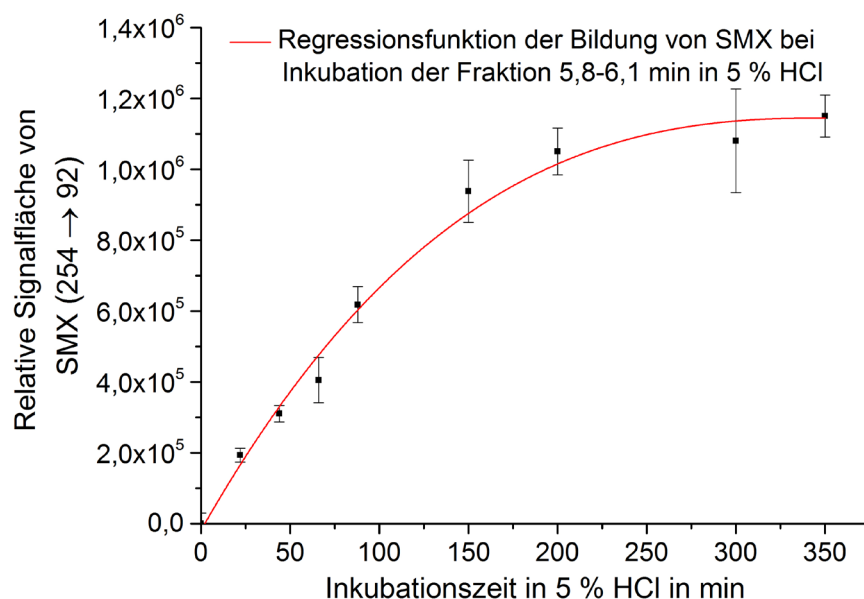


Abbildung 24: *Gemessene Signalintensität des Massenübergangs 254 → 92 für SMX bei Inkubation der isolierten Fraktion 5,8-6,1 min des Ablaufs 1, erhalten unter Verwendung der HPLC-Methode 1, in einer 5 %igen HCl-Lösung bei Raumtemperatur.*

Die zeitabhängige Bildung von SMX war klar zu erkennen. Neben dem MRM-Übergang 254 → 92, waren auch die Übergänge 254 → 108 und 156, zu der erwarteten Elutionszeit und den entsprechenden Intensitätsverhältnissen wie für den SMX-Referenzstandard nachweisbar. Dies zeigte, dass der Fraktion 5,8-6,1 min die zusätzlich gebildete Menge an SMX zugeordnet werden konnte. Ob es noch eine weitere Quelle für die zusätzlich gebildete SMX-Konzentration gibt, bleibt unklar. Es konnte jedoch keine weitere detektiert werden. Der kinetische Verlauf deutete darauf hin, dass nach etwa 5 h die Bildung von SMX abgeschlossen war. Die Hydrolyse lief daher ähnlich schnell ab wie die Spaltung der Amidbindung des *N*⁴-Acetyl-SMX, wobei eine deutlich geringere HCl-Konzentration notwendig war. Dies deutet darauf hin, dass es sich wahrscheinlich nicht um eine Amidbindung handelt, welche gespalten wird. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurde der SMX-Isotopenstandard zur Probe dotiert und so die gebildete SMX-Menge quantifiziert. Da durch die Fraktionierung die Information über den Anreicherungsfaktor nicht verloren ging, konnte die gebildete SMX-Konzentration auch auf die nicht angereicherte Probe zurückgerechnet werden. Aus dieser SMX-Konzentration und der SMX-Äquivalentkonzentration im SMX-LC-ELISAGramm für die Fraktion um 6 min ließ sich die Kreuzreaktivität berechnen, obwohl der Stoff nicht identifiziert und isoliert vorlag. Es

ergab sich eine Kreuzreaktivität von $460 \pm 150 \%$. Ob diese Kreuzreaktivität von einem Stoff oder einer Mischung mehrerer Stoffe hervorgerufen wird, ist unklar. Zudem sind die Umsatzrate der sauren Hydrolyse und die genaue Signalintensität des Interferenzsignals bei 6 min unbekannt. Die errechnete Kreuzreaktivität sollte daher als Abschätzung angesehen werden. Da der Stoff bzw. die Stoffe unbekannt sind, ist auch nichts über deren molare Masse bekannt. Eine Konzentrationsangabe in ng/L ist daher nicht möglich. Aber ausgehend von der gebildeten Menge an SMX lässt sich die Molarität errechnen. Die Molarität ist vergleichbar hoch wie die von *N*⁴-Acetyl-SMX, welches für die nicht angereicherte Ablaufprobe mit einer Konzentration von rund 150 ng/L nachzuweisen war.

Zur Reduktion von Interferenzen wurde die saure Hydrolyse angewendet. Durch deren Einsatz konnte der Kreuzreaktant *N*⁴-Acetyl-SMX zu SMX hydrolysiert werden. Besonders für die Klärwerkszulaufproben, in denen relativ hohe Konzentrationen an *N*⁴-Acetyl-SMX gemessen werden konnten, können dadurch Überbestimmungen reduziert werden. Nach Eliminierung von *N*⁴-Acetyl-SMX war jedoch weiterhin ein Signal im SMX-LC-ELISAGramm bei der Elutionszeit von 10 min messbar. Im Klärwerksablauf erfolgte eine geringere Reduktion des Signals bei 10 min, weil auch geringere Konzentrationen an *N*⁴-Acetyl-SMX im Ablauf nachweisbar waren. Die saure Hydrolyse führte neben der Eliminierung von *N*⁴-Acetyl-SMX auch zur Reduktion des Interferenzsignals im SMX-LC-ELISAGramm bei 6 min. Bei saurer Hydrolyse der Fraktion bei 6 min konnte die Bildung von SMX nachgewiesen werden. Aus der gebildeten Menge an SMX und der Signalintensität im SMX-LC-ELISAGramm wurde eine Kreuzreaktivität von $460 \pm 150 \%$ abgeschätzt. Die hohe Kreuzreaktivität und die Tatsache, dass aus dieser Fraktion SMX gebildet werden konnte, waren ein klares Indiz, dass es sich um einen SMX-Metaboliten und damit spezifisch bindenden Kreuzreaktanden handeln könnte. Es wurden verschiedene Sulfonamide und verschiedene SMX-Metaboliten vermessen. Bei Veränderung des SMX-spezifischen 5-Methylisoxazolrings oder einer Substitution an der *N*¹-Position von SMX sanken die Kreuzreaktivitäten massiv auf etwa 1 % und darunter ab. Für Metaboliten, bei denen SMX an der *N*⁴-Position substituiert war, wurden Kreuzreaktivitäten von etwa 200-1000 % gemessen. Die Kreuzreaktivität von etwa 460 % lässt die Vermutung zu, dass es sich analog zum *N*⁴-Acetyl-SMX, um einen *N*⁴-Metaboliten handeln könnte. Die leichtere Hydrolyse zum SMX deutet darauf hin, dass die Verknüpfung nicht durch eine Amidbindung erfolgt. Bei einer Konjugation mit dem Stickstoff an der *N*⁴-Position könnte es sich zum Beispiel um eine Carbamatbindung handeln.

2.2.4 Unterscheidung von spezifischen und unspezifischen Interferenzen

Die SMX-LC-ELISAGramme zeigten für den Zulauf 1 auch nach Eliminierung von N^4 -Acetyl-SMX weiterhin ein Interferenzsignal. Für den Ablauf 1 ergab sich ein noch komplexeres LC-ELISAGramm. Die Identifizierung von Kreuzreaktanden aus Umweltproben ist ein sehr ambitioniertes Ziel. Die Identifizierung von unspezifisch bindenden Stoffen ist aufgrund ihrer nicht notwendigerweise ähnlichen Strukturformel zum Zielanalyten noch viel anspruchsvoller. Um den Aufwand, der für die Identifizierung von Interferenzsignalen betrieben werden muss, zu reduzieren und um eine effektivere Herangehensweise zu deren Eliminierung zu ermöglichen, sollte zwischen spezifischen Interferenzen (Kreuzreaktanden) und unspezifischen Interferenzen unterschieden werden können. Diese Unterscheidung ist nicht trivial, wenn die Konzentration der Stoffe unbekannt ist. In gleicher Weise störende Interferenzsignale im LC-ELISAGramm können auftreten, wenn ein an den Antikörper spezifisch bindender Stoff mit hoher Kreuzreaktivität, aber geringer Konzentration vorliegt oder ein Stoff mit geringer Affinität zum Antikörper und damit niedriger Kreuzreaktivität in hoher Konzentration vorliegt. Um eine Unterscheidung zu ermöglichen, wurde der Ansatz verfolgt, dass die Bindungsaffinität von unspezifisch bindenden Stoffen häufig konzentrationsabhängig ist. Wird eine Probe verdünnt und damit die Konzentration des Stoffes reduziert, binden überproportional weniger Moleküle am Antikörper. Man kann sich den Effekt ähnlich wie bei der Signalsuppression in der Massenspektrometrie vorstellen. Wenn die vorhandenen Ladungen nicht mehr ausreichen um alle Moleküle zu ionisieren, werden hauptsächlich die Moleküle ionisiert und gemessen, welche in der Mehrzahl vorliegen. Vergleichbar ist es beim ELISA. Liegt die Anzahl der Moleküle in der Probe viel höher als die der Antikörper werden hauptsächlich die Stoffe mit den Antikörpern wechselwirken, welche in der Mehrzahl vorliegen. Die Selektivität der Antikörper geht dabei ein Stück weit verloren. Durch Verdünnung der Probe können in der Massenspektrometrie Signalsuppressionseffekte reduziert werden und beim ELISA die Selektivität erhöht werden. Dass durch Verdünnung der Probe eine Reduktion der Interferenzen möglich ist, wurde schon in Tabelle 2 gezeigt. Für die Vermessung von Zulauf 1 wurde dieser zuvor mit 16 %iger HCl behandelt, um N^4 -Acetyl-SMX zu entfernen. Das verbleibende Signal bei etwa 10 min konnte anschließend nicht mehr durch N^4 -Acetyl-SMX beeinflusst sein und wurde hinsichtlich der Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Interferenz untersucht. Dabei wurde Zulauf 1 nach Hydrolyse bei unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren mittels LC-ELISA vermessen. Um die Proportionalität bzw. Disproportionalität zu erkennen, wurden die erhaltenen Ergebnisse auf einen Anreicherungsfaktor von 0,625 normiert (Abbildung 25).

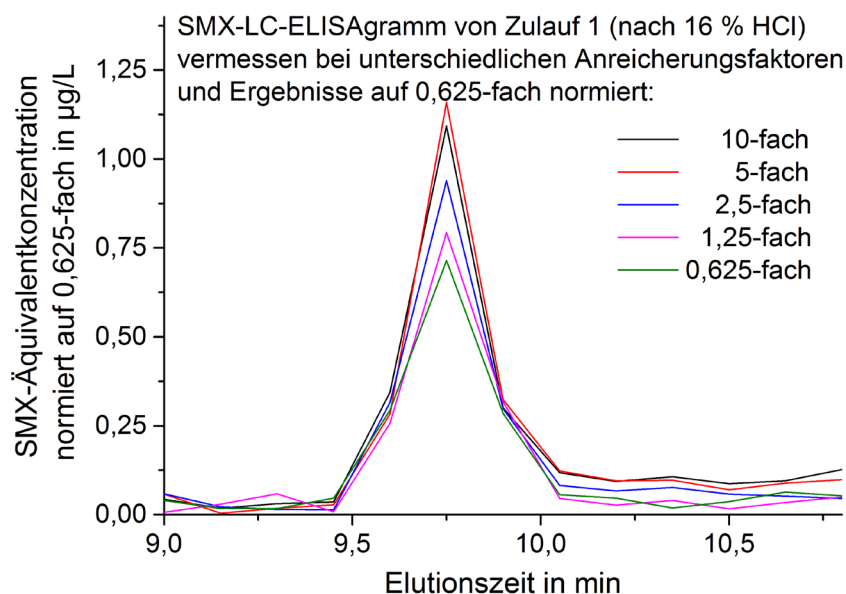


Abbildung 25: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Zulauf 1 nach 24-stündiger Inkubation mit 16 %iger HCl und Vermessung bei unterschiedlichen Anreicherungs-faktoren (erhaltene Ergebnisse auf einen Anreicherungs-faktor von 0,625-fach normiert).

Es ist zu erkennen, dass für höhere Anreicherungs-faktoren überproportional höhere SMX-Äquivalentkonzentrationen gemessen wurden. Durch Verdünnung der Probe sinkt die normierte Äquivalentkonzentration im Durchschnitt stetig leicht ab. Das Signal bei etwa 10 min ist daher, wahrscheinlich auf eine unspezifische Interferenz zurückzuführen. Bei etwa 10 min erreicht der Wasser-Methanol-Gradient, unter Berücksichtigung der Totzeit des Systems, den höchsten Anteil an Methanol und hat dadurch die höchste Elutionskraft. Es erscheint plausibel, dass dort viele Stoffe eluieren, wie auch in Abbildung 17 zu erkennen ist. Die Wahrscheinlichkeit ist relativ hoch, dass es zu einer Interferenz kommt, wenn viele Stoffe zu einer dem Analyten ähnlichen Elutionszeit eluieren. Diese Stoffe weisen vermutlich eine ähnliche Polarität auf, wovon einzelne eine geringe Bindungsaffinität zum Antikörper besitzen können. Ablauf 1 wurde ebenfalls bei unterschiedlichen Anreicherungs-faktoren vermessen. Auf eine vorherige saure Hydrolyse wurde aber verzichtet, um das LC-ELISAGramm, besonders im Hinblick auf das Signal um 6 min, nicht zu verfälschen (Abbildung 26). Das Signal für SMX um 9 min zeigte wie erwartet ein proportionales Verhalten und unterschied sich für die normierten LC-ELISAGramme nicht signifikant. Das Signal bei 6 min zeigte ebenfalls ein proportionales Verhalten, welches die These eines SMX-Metaboliten und damit spezifisch bindenden Kreuzreaktanden aus Kapitel 2.2.3 unterstützt. Das Signal bei 7 min, welches im Ausschnitt vergrößert dargestellt ist, zeigte ein disproportionaler Verhalten.

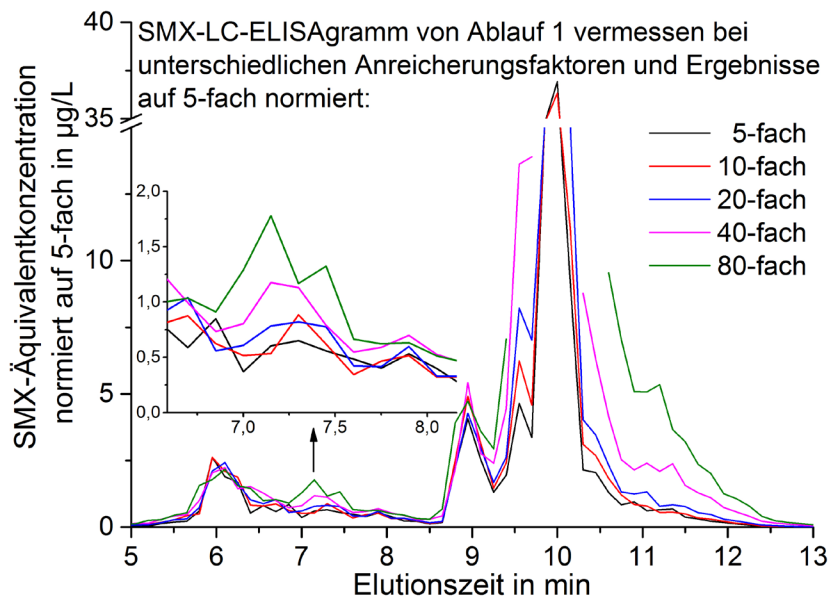


Abbildung 26: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Ablauf 1 bei Anwendung unterschiedlicher Anreicherungs-faktoren (erhaltene Ergebnisse auf einen Anreicherungs-faktor von 5-fach normiert).

Mit steigendem Anreicherungs-faktor stieg die gemessene Äquivalentkonzentration trotz Normierung an. Dies war auch extrem deutlich für das Signal bei 9,5 min und für die Signalschulter bei 10,5-12 min zuerkennen. Diese Signale sollten unspezifisch bindenden Stoffen zugeordnet werden. Auffällig war, dass die Äquivalentkonzentrationsdifferenz zwischen den LC-ELISAGrammen für steigende Anreicherungs-faktoren zunahm. Die Anreicherungs-faktoren unterschieden sich stets um den Faktor 2. Für hohe Anreicherungs-faktoren war aber der normierte Äquivalentkonzentrationsunterschied deutlich größer, als bei niedrigen Anreicherungs-faktoren. Mit steigender Verdünnung näherten sich die normierten Signalintensitäten einer Art Grenzwert an. Dieser Effekt war auch schon in Tabelle 2 abzulesen. Durch Verdünnung lassen sich, relativ zum Zielanalytsignal, Interferenzsignale unspezifisch bindender Stoffe absenken, aber zu deren weiterer Reduktion sind immer höhere Verdünnungen notwendig. Um die Interferenz unspezifisch bindender Stoffe zu eliminieren sind so hohe Verdünnungen notwendig, welche nur bei sehr nachweisstarken ELISAs oder hohen Zielanalytkonzentrationen in den Proben möglich sind. Teilweise überstiegen die gemessenen Konzentrationen, besonders bei hohen Anreicherungs-faktoren, den Arbeitsbereich des SMX-ELISAs. Daher wurde für diese Fraktionen keine Konzentration angegeben, was der Grund für die Lücken in den Linien in Abbildung 26 ist. Auch wenn die Disproportionalität für manche Signale sehr deutlich ist, muss erwähnt werden, dass dieser Ansatz zur Unterscheidung von Kreuzreaktanden und unspezifisch bindenden Stoffen nicht sicher ist.

Kreuzreaktanden können, anders als in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt, auch eine konzentrationsabhängige Kreuzreaktivität besitzen. Ein Beispiel ist *N*⁴-Acetyl-SMX, wie in Abbildung 27 gezeigt.

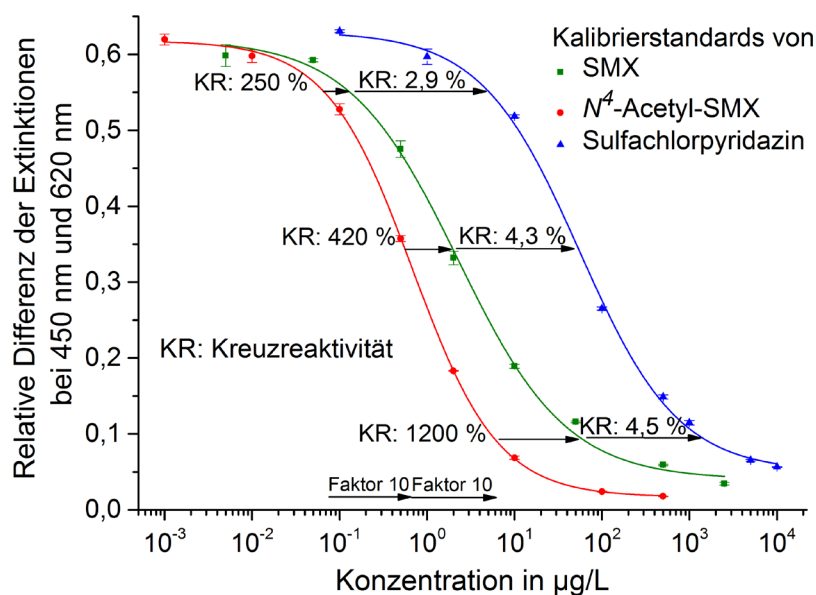


Abbildung 27: Kalibrierfunktionen von *N*⁴-Acetyl-SMX, SMX und Sulfachlorpyridazin mit Angabe der entsprechenden Kreuzreaktivität für ausgewählte Konzentrationen im Arbeitsbereich.

Innerhalb des Arbeitsbereiches der Kalibrierfunktionen wurden 3 Konzentrationen ausgewählt, welche jeweils um den Faktor 10 voneinander verschieden sind. Für diese Konzentrationen wurden jeweils die Kreuzreaktivität für *N*⁴-Acetyl-SMX und Sulfachlorpyridazin errechnet. Es zeigte sich schon bei der einfachen Betrachtung der Kalibrierfunktionen, dass die Kurve von SMX und Sulfachlorpyridazin nahezu parallel verliefen, jedoch die Kurve von *N*⁴-Acetyl-SMX einen anderen Anstieg besaß. Im Falle der nahezu Parallelität der Kurven verändert sich die Kreuzreaktivität kaum. Bei der Kalibrierfunktion von *N*⁴-Acetyl-SMX nahm der Abstand zur Kurve von SMX mit steigender Konzentration zu und so auch die Kreuzreaktivität. Würde man das in diesem Kapitel beschriebene Verdünnungsexperiment mit einem Anreicherungsunterschied von Faktor 10 für *N*⁴-Acetyl-SMX anwenden, würde man eine Disproportionalität mit Anstieg der normierten Signalintensität von bis zu etwa Faktor 3 für höhere Anreicherungs-faktoren beobachten. Dieser hohe Disproportionalitätsfaktor würde zur falschen Schlussfolgerung einer unspezifischen Interferenz führen.

Mit diesem Beispiel kann gezeigt werden, dass es sich mit dem Verdünnungsexperiment um einen Ansatz und keinen Beweis der Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung handelt. Da die obere Asymptote (A-Wert) bei sehr geringen Analytkonzentrationen erhalten wird, ist diese quasi

stoffunabhängig. Alle Stoffe werden daher einen ähnlichen A-Parameter in der 4-Parameter-Gleichung aufweisen. Wenn zwei Stoffe eine Kalibrierfunktion mit unterschiedlicher Steigung besitzen, werden sich die Kurven, dem Strahlensatz folgend, mit steigender Konzentration immer weiter voneinander entfernen oder annähern. Im Hinblick auf eine sich so wenig wie möglich durch Konzentrationsänderung verändernde Kreuzreaktivität, sollten für das Verdünnungsexperiment Anreicherungsfaktoren gewählt werden, welche idealerweise Signalkonzentrationen im unteren quantifizierbaren Konzentrationsbereich ergeben. Bei der Konzentrationssteigerung um Faktor 10 im unteren Konzentrationsbereich stieg die Kreuzreaktivität von *N*⁴-Acetyl-SMX um etwa den Faktor 1,7 an. Für die Konzentrationssteigerung um Faktor 10 im oberen Konzentrationsbereich stieg die Kreuzreaktivität um etwa den Faktor 2,9. Bei der Kalibrierfunktion von *N*⁴-Acetyl-SMX war der Anstieg der Funktion, bei logarithmischer Auftragung der Konzentration, größer als für SMX und die Kreuzreaktivität über 100 %. Die Kalibrierfunktionen entfernen sich voneinander zunehmend mit ansteigender Konzentration. Zeigt die Kalibrierfunktion des Kreuzreaktanden jedoch einen geringeren Anstieg als die des Zielanalyten und die Kreuzreaktivität liegt oberhalb von 100 %, nähern sich Kalibrierfunktionen mit steigender Konzentration an. Die Kreuzreaktivität würde mit zunehmender Konzentration abnehmen. Auch in diesem Fall würde eine Disproportionalität im Verdünnungsexperiment beobachtet werden, wobei mit steigendem Anreicherungsfaktor die normierte Signalintensität abnehmen würde und so keine Verwechslung mit unspezifisch bindenden Stoffen bestünde.

Es wurde versucht, durch Vermessung der Probe bei unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren und einer anschließenden Normierung der Ergebnisse auf einen einheitlichen Anreicherungsfaktor zwischen spezifischen und unspezifischen Interferenzen zu unterscheiden. Die Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass das Signal bei ca. 10 min in Zulauf und Ablauf auf unspezifische Interferenzen zurückzuführen ist. Zudem war auch das Signal bei etwa 7 min in dem SMX-LC-ELISAGramm für den Ablauf wahrscheinlich eine unspezifische Interferenz. Das Signal bei 6 min zeigte jedoch ein proportionales Verhalten wie SMX und ist daher wahrscheinlich einem Kreuzreaktanden zuzuordnen, was auch die Ergebnisse aus Kapitel 2.2.3 unterstützen. Eine eindeutige Einordnung von spezifischer und unspezifischer Interferenz ist jedoch nicht ohne Identifizierung des Stoffes möglich. Über die in einer Probe vorhandenen unbekannten Kreuzreaktanden kann keine Information vorliegen und die Kalibrierfunktion von *N*⁴-Acetyl-SMX zeigte, dass auch Kreuzreaktanden eine konzentrationsabhängige Bindungsaffinität, genauer gesagt Kreuzreaktivität, aufweisen können. Dieser Tatsache sollte bei der Bewertung von in der Literatur und dieser Arbeit angegebenen Kreuzreaktivitäten Beachtung geschenkt werden. Die angegebene Kreuzreaktivität bezieht sich nur auf einen

Konzentrationswert des Referenzanalyten, meist dem C-Wert. Genauer wäre es alle 4-Parameter der 4-Parameter-Gleichung von Stoffen anzugeben, um so die Kalibrierfunktionen besser miteinander vergleichen zu können.

2.2.5 Einfluss des Probenpuffers

In der Literatur wurden weitere Möglichkeiten zur Reduktion von Interferenzen beschrieben. Durch einen Wechsel des pH-Wertes kann sich die Kreuzreaktivität von Stoffen ändern [35] und durch einen Zusatz von 1 % Rinderserumalbumin (BSA) zur Probe unspezifische Interferenzen reduziert werden [20,32]. Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde der Einfluss des pH-Wertes der Probe und der eines Zusatzes an 1 % BSA auf die SMX-LC-ELISAGramme des Ablaufs 1 getestet. Im Gegensatz zum ansonsten angewendeten Verfahren des LC-ELISAs wurden die gesammelten Fraktionen nicht mit dem Neutralisationspuffer neutralisiert, sondern direkt im Druckluftstrom getrocknet. Anschließend wurden die trockenen Fraktionen für die ELISA-Messung nicht in Reinstwasser sondern in den jeweiligen Pufferlösungen aufgenommen und auf die ELISA-Platte übertragen. Während des SMX-ELISAs wurden zu 100 µL Probe je Kavität 100 µL Tracer-Lösung gelöst in einem Tris-Puffer mit pH = 8,5 zugegeben. Daher ergaben sich etwas abweichende Misch-pH-Werte für den Schritt der Bindung von Probeninhaltsstoffen und Tracer an den Antikörper. Die verwendeten Pufferlösungen hatten einen pH-Wert von 4,5 (Misch-pH-Wert: 4,9), 7,6 (Misch-pH-Wert: 8,0) und 9,5 (Misch-pH-Wert: 9,5). Des Weiteren wurde die Pufferlösung pH = 7,6 mit einem Zusatz von 1 % Rinderserumalbumin getestet. Die erhaltenen SMX-LC-ELISAGramme sind in Abbildung 28 gezeigt. Die erhaltenen SMX-LC-ELISAGramme waren unabhängig von den verwendeten Pufferlösungen sehr ähnlich. Eine drastische Reduktion von Interferenzsignalen durch Änderung des pH-Wertes oder Zusatz von Rinderalbumin, wie sie in der Literatur beschrieben wurde, konnte nicht beobachtet werden. Für das Signal bei 10 min konnte durch Einsatz von Rinderserumalbumin sogar eine Interferenzsignalverstärkung beobachtet werden. Eine geringfügige Absenkung von Interferenzsignalen konnte lediglich für die Signale um 4 min und 7 min bei Anwendung der Pufferlösung mit pH = 4,5 beobachtet werden. Auffällig war, dass nur die Signalintensität von SMX bei 8,7 min und das Signal bei um 6 min unabhängig vom verwendeten Puffer gleich intensiv war.

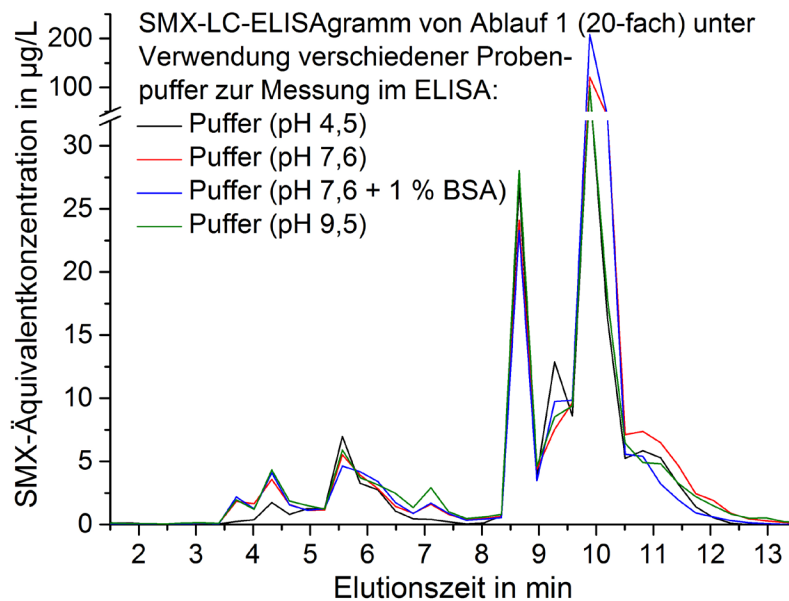


Abbildung 28: Überlagerung von SMX-LC-ELISAgrammen von Ablauf 1 unter Anwendung unterschiedlicher Probenpufferlösungen für die Wiederaufnahme der getrockneten Fraktionen und Messung im ELISA unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Von Anwendung der Pufferlösung mit pH = 4,5 ist jedoch abzuraten, da die Quantifizierung unter diesen Bedingungen erschwert wird, wie an den Kalibrierfunktionen in Abbildung 29 zu erkennen ist.

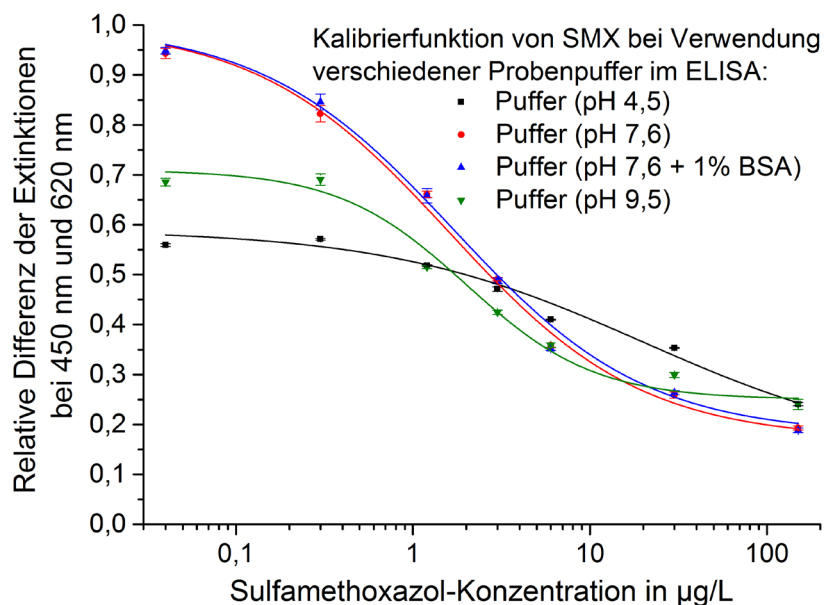


Abbildung 29: Kalibrierfunktionen von SMX gelöst in unterschiedlichen Pufferlösungen, welche auch für die LC-ELISAgramme in Abbildung 28 verwendet wurden.

Die Kalibrierfunktionen, welche unter Verwendung von Pufferlösung pH = 7,6 und mit einem Zusatz von 1 % BSA erhalten wurden, können als gleich angesehen werden. Sie zeigten die höchsten Extinktionen und den niedrigsten C-Wert und damit höchste

Empfindlichkeit. Bei Anwendung des Probenpuffers mit pH = 9,5 sank der A-Wert ab und die Empfindlichkeit verschlechterte sich leicht. Für die Kalibrierfunktion unter Verwendung des Probenpuffers pH = 4,5 wurde ein deutlich reduzierter A-Wert und eine deutliche Verschiebung des C-Wertes von etwa Faktor 10 erhalten. Der ELISA war daher deutlich unempfindlicher. In dieser Unempfindlichkeit ist vielleicht auch die leichte Reduktion der Signalintensitäten bei 4 min und 7 min zu erklären, welche nach Ergebnissen aus Kapitel 2.2.4 unspezifischen Interferenzen zuzuordnen sind.

Es stellte sich die Frage was der Grund für die unterschiedlichen A-Werte und C-Werte, abhängig vom pH-Wert des Puffers, war. Denkbar ist eine Beschädigung der Antikörper, eine Beeinflussung der Enzymaktivität des Tracers oder eine veränderte Gleichgewichtseinstellung von an den Antikörpern gebundenen und nicht gebundenen Analyt bzw. Tracer. Um eine Beschädigung der Antikörper zu testen wurden die an der Mikrotiterplatte gebundenen anti-SMX Antikörper für 30 min in den entsprechenden Mischungen aus jeweiligen Probenpuffer und Tris-Puffer inkubiert. Anschließend wurde der Puffer aus den Kavitäten entfernt und der SMX-ELISA mit den üblichen ELISA-Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Kalibrierfunktionen sind in Abbildung 30 A gezeigt. Um den Einfluss auf die Enzymaktivität zu testen wurde der Tracer, gelöst in den Mischungen der unterschiedlichen Pufferlösungen mit Tris-Puffer, in einer nicht-bindenden Mikrotiterplatte für 30 min inkubiert. Die behandelten Tracer-Lösungen wurden 1:10 in Reinstwasser verdünnt, um deren Pufferstärke zu reduzieren. Die verdünnten Lösungen wurden anschließend in einem Verhältnis von 1:10 zu der Substrat-Lösung gegeben und die sich nach 30 min ergebende Extinktion gemessen (Abbildung 30 B).

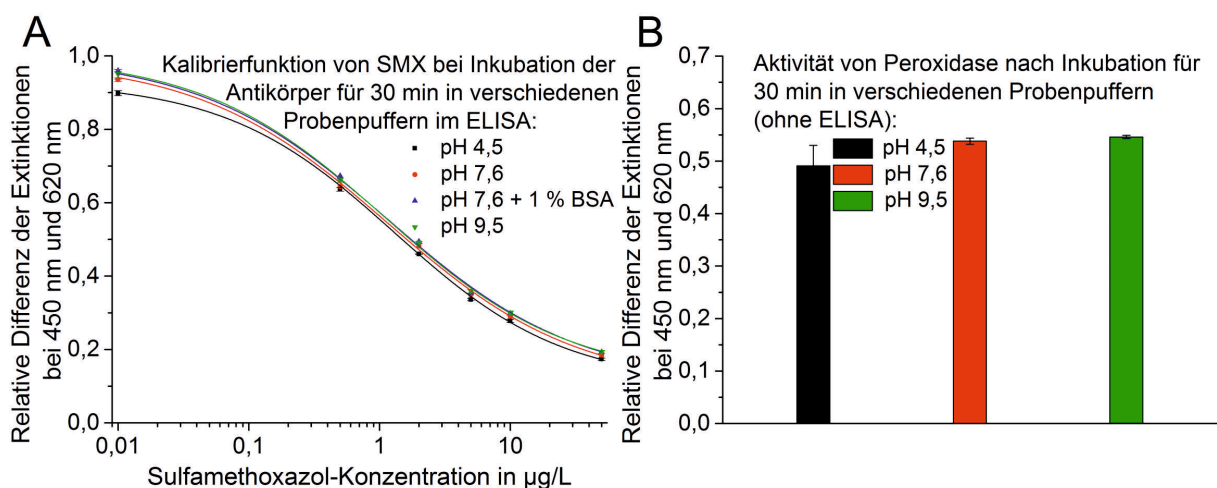


Abbildung 30: (A) Kalibrierfunktionen von SMX nach Inkubation, der mit Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte, in den verschiedenen Pufferlösungen, welche auch für die LC-ELISAGramme in Abbildung 28 verwendet wurden. (B) erhaltene Extinktionen nach Inkubation von Tracer-Lösung mit unterschiedlichen Pufferlösungen in einer nicht-bindenden und nicht mit Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatte.

Die Ergebnisse in Abbildung 30 A zeigen, dass durch die Behandlung mit den unterschiedlichen Pufferlösungen keine deutliche Beschädigung der Antikörper erfolgte. Lediglich bei Verwendung der Mischung mit Probenpuffer pH = 4,5 sank der A-Wert leicht ab. Eine Verschiebung der C-Werte der Kurven war jedoch nicht zu erkennen. Bei Inkubation des Tracers in den unterschiedlichen Mischungen konnte nur für den Probenpuffer pH = 4,5 eine leichte und signifikante Absenkung der Extinktion beobachtet werden (Abbildung 30 B). Der Extinktionswert lag aber im Vergleich zu den anderen Probenpuffern immer noch bei über 90 % und kann nicht die deutliche Absenkung des A-Wertes für die Kalibrierfunktion in Abbildung 29 erklären. Die deutlich verschiedenen Kalibrierfunktionen müssen im Schritt der Gleichgewichtseinstellung von an den Antikörpern gebundenen und nicht gebundenen Analyt bzw. Tracer begründet sein. Eine mögliche Erklärung des stark erhöhten C-Wertes und reduzierten A-Wertes für SMX bei Verwendung des Probenpuffers pH = 4,5 kann eventuell in dem pK_s -Wert von 5,6 für SMX liegen [93]. Es handelt sich bei dem Proton an der N^1 -Position von SMX um ein saures Proton, welches leicht im neutralen Milieu deprotoniert wird (Abbildung 31).

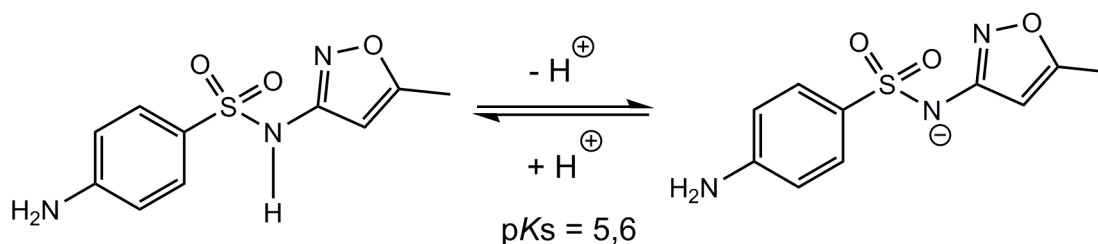


Abbildung 31: *N*-H-Acidität von Sulfamethoxazol mit pK_s von 5,6.

Bei Verwendung des Probenpuffers pH = 7,6 liegt die N^1 -Position deprotoniert vor, wie sie auch während der Immunisierung unter physiologischen pH-Wert vorlag. Die Antikörper wurden daher gegen die deprotonierte Form von SMX gebildet. Bei Anwendung des Probenpuffers mit pH = 4,5 und einem Misch-pH-Wert von 4,9 liegen etwa 85 % der SMX-Moleküle und damit auch Tracer-Moleküle jedoch protoniert vor. Sie unterscheiden sich vom Immunogen in ihrem Ladungszustand und können wahrscheinlich schlechter binden. Dies führt zum reduzierten A-Wert aufgrund der geringeren Anzahl an gebundenem Tracer und zu einem höheren C-Wert, aufgrund der geringeren Affinität der Antikörper gegen die protonierte Form. Die Kreuzreaktivität des protonierten SMX ist deutlich geringer als die des deprotonierten SMX. Die Verschiebung des C-Wertes der Kalibrierfunktion zu höheren Konzentrationen von etwa Faktor 10, ist in grober Näherung die Reduktion des Anteils an deprotonierten SMX. Für das an der N^1 -Position glucuronidierte SMX,

welches daher dort nicht deprotoniert werden kann, betrug die Kreuzreaktivität etwa 1 %. Der C-Wert ist um den Faktor 100 zu höheren Konzentrationen verschoben.

Es wurde der Einfluss des pH-Wertes und Zusatzes von 1 % Rinderserumalbumin auf die LC-ELISAGramme getestet. Anders als in der Literatur beschrieben, konnten dabei aber keine nennenswerten Reduktionen von Interferenzen beobachtet werden. Auffällig war, dass bei Anwendung des Probenpuffers mit pH = 4,5 für die Kalibrierfunktion ein deutlich geringerer A-Wert und erhöhter C-Wert erhalten wurde. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich an der Protonierung der *N*¹-Position des Sulfamethoxazols, welches in protonierter Form eine geringere Bindungsaffinität zum Antikörper zeigt.

2.2.6 Einfluss des Tracers

Ein in der Literatur beschriebener Ansatz, um Selektivität und Sensitivität eines Immunoassays zu verbessern, ist der Einsatz eines anderen Tracers. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass beim Immunoassay zur Quantifizierung nur Antikörper an die der Tracer bindet von Bedeutung sind. Wenn ein anderer Tracer verwendet wird, bindet dieser an andere Antikörper, welche eine andere Selektivität und Bindungsaffinität aufweisen können. Da genauer gesagt nicht der Tracer, sondern das an die Detektionseinheit gekoppelte Hapten an den Antikörper bindet, muss dieses verändert werden. Die Synthese eines Haptens, kann sich sehr aufwendig gestalten und sollte nicht als erste Möglichkeit zu Interferenzreduktion gewählt werden. In der Literatur wurde beschrieben, dass besonders große Unterschiede der Assay-Selektivität erreicht werden können, wenn die Verknüpfung von Hapten und Detektionseinheit an einer anderen Position des Analyten erfolgt. Als Hapten wurde für die Immunisierung und den bisherigen Tracer ein *N*⁴-Succinimidyl-Sulfamethoxazol verwendet. Dieses Hapten ist dem *N*⁴-Acetyl-SMX strukturell sehr ähnlich. Dessen hohe Kreuzreaktivität ist daher nicht überraschend. Für SMX und allgemein für Sulfonamide sind in der Literatur nur zwei Haupttypen von Haptenstrukturen zu finden. Der eine Typ umfasst eine Derivatisierung an der *N*⁴-Position und der zweite Typ eine Substitution des SMX-spezifischen 5-Methylisoxazolrings. Beispiele [94-100] sind im Anhang in Abbildung A1 gezeigt. Beide Typen haben einen Nachteil. Eine Derivatisierung an der *N*⁴-Position ist aufgrund der hohen Reaktivität der Aminofunktion einfach, führt aber zur hohen strukturellen Ähnlichkeit mit den natürlich vorkommenden Hauptmetaboliten von SMX und vieler anderer Sulfonamide, den *N*⁴-Acetyl-Derivaten. Eine Substitution des für das SMX spezifischen Rings führt zu einer Haptenstruktur, welche auch hohe Ähnlichkeit mit anderen Sulfonamiden aufweist.

In dieser Arbeit wird ein neu entwickelter Typ eines Haptens vorgestellt. Dabei erfolgt die Anbindung der Brücke an der N^1 -Position des SMX. Die N^4 -Position und der 5-Methylisoxazolring bleiben unverändert, was eine Interferenz mit an N^4 -Position substituierten Metaboliten und anderen Sulfonamiden stark reduzieren sollte. Zunächst wurde das an N^4 -Position mit Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) geschützte SMX an der N^1 -Position mit einem Säurechlorid konjugiert. Es zeigte sich jedoch, dass die dabei gebildete Amidbindung labil gegenüber Hydrolyse war. Im Säuren (0,6 % HCl) betrug die Halbwertszeit etwa 6 Tage und im leicht Basischen (pH = 8,1) wurde die Bindung in weniger als 2 h zu etwa 50 % hydrolysiert. Das Hapten könnte als Tracer bei Lagerung und Anwendung im leicht sauren Milieu dienen. Es könnte jedoch nicht zur Immunogensynthese verwendet werden. Unter physiologischem pH-Wert und bei Interaktion mit dem Immunsystem eines Tieres, würde SMX von der Brücke abgespalten werden. Es würden dann lediglich Antikörper gegen das Trägerprotein und die Brücke gebildet werden, aber nicht gegen SMX. Daher wurde eine sehr viel aufwendigere Synthesestrategie entwickelt, bei der die Verknüpfung zwischen N^1 -Position und Brücke über eine kovalente N-CH₂-Bindung erfolgt. Diese Bindung zeigte Stabilität gegen Hydrolyse im stark basischen (10 % NaOH) und stark saurem Milieu (12 % H₂SO₄). Zur Darstellung des neuen Haptens bzw. einer direkten Vorgängerverbindung (Fmoc-geschütztes Hapten **10**) wurde eine lineare 10-Stufen-Synthese durchgeführt, welche schematisch im Anhang in Abbildung A2 gezeigt ist. Die hohe Anzahl an Reaktionsstufen war notwendig, da das Hapten quasi in einer Totalsynthese aufgebaut werden musste. Es bestand dabei die Schwierigkeit, dass zwei nukleophile Gruppen, eine Amino-Funktion und eine Hydroxy-Funktion bzw. Carbonsäure-Funktion, vorlagen. Die unerwünschte Reaktion der jeweils anderen Funktion musste durch Einsatz von Schutzgruppen vermieden werden. Für die Aufreinigung der einzelnen Stufen war nur das Waschen mit Reinstwasser zur Entfernung von Verunreinigungen oder das Waschen mit ACN zur Extraktion des gewünschten Produkts nötig. Das Produkt der zehnten Stufe wurde mittels HPLC aufgereinigt, wobei sich für das aufgereinigte isolierte Produkt eine Gesamtausbeute über die 10 Stufen von 26 % ergab. Diese sehr gute Gesamtausbeute war möglich, da die einzelnen Reaktionen optimiert wurden und der Reaktionsverlauf mittels LC-MS und LC-UV überwacht wurde. Zudem führten die einfachen Aufreinigungen der Zwischenstufen kaum zu Verlusten. Die Carbonsäure der Vorstufe **10** wurde für die Synthese eines BSA-Konjugats (Immunogen) aktiviert und anschließend mit den Amino-Funktionen des Rinderserumalbumins gekoppelt. Nachdem kein aktiviertes **10** mittels LC-MS in der Reaktionslösung mehr nachweisbar war, wurde die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Die Fmoc-Schützung wurde durchgeführt um eine intramolekulare Reaktion mit der aktivierten Carbonsäure oder intermolekulare Reaktion mit anderen aktivierten **10**-Molekülen zu verhindern. Für die Synthese des Tracers **13** musste ein anderer Reaktionsweg

gewählt werden. Eine abschließende Entschützung, d.h. Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe benötigte Reaktionsbedingungen, welche zur Inaktivierung der Peroxidase geführt hätten. Daher wurde für die Tracersynthese zunächst die Fmoc-Schutzgruppe entfernt, dann die Carbonsäure aktiviert und an die Amino-Funktionen der Peroxidase gekoppelt. Eine befürchtete Dimerisierung von entschütztem und aktiviertem Hapten konnte mittels LC-MS nicht nachgewiesen werden. Die schematische Darstellung der Synthese des neuen Tracers **13** und neuen Immunogens **16** ist im Anhang in Abbildung A3 gezeigt. Zur Aufreinigung der Reaktionsmischungen wurde jeweils die Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von PD10-Säulen angewendet. Dabei eluieren zunächst Verbindungen mit einem großen und später Verbindungen mit einem kleinen hydrodynamischen Durchmesser. Da **13** als Peroxidase-Konjugat und **16** als BSA-Konjugat eine Masse aufweisen, welche mehr als 100-fach größer ist als die des Haptens, unterscheiden sich auch die hydrodynamischen Durchmesser stark genug voneinander, um sie effizient zu trennen. Ein erhaltenes Elutionsprofil ist im Anhang in Abbildung A4 dargestellt. Die Fraktionen 12 bis 14, welche die höchsten Extinktionswerte für POD lieferten, wurden vereinigt und mittels Matrix unterstützter Laser-Desorption/-Ionisierung und nachfolgender Flugzeitanalyse-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) vermessen. In Abbildung 32 ist das erhaltene Massenspektrum von **13** und als Vergleich das der reinen Peroxidase wiedergegeben.

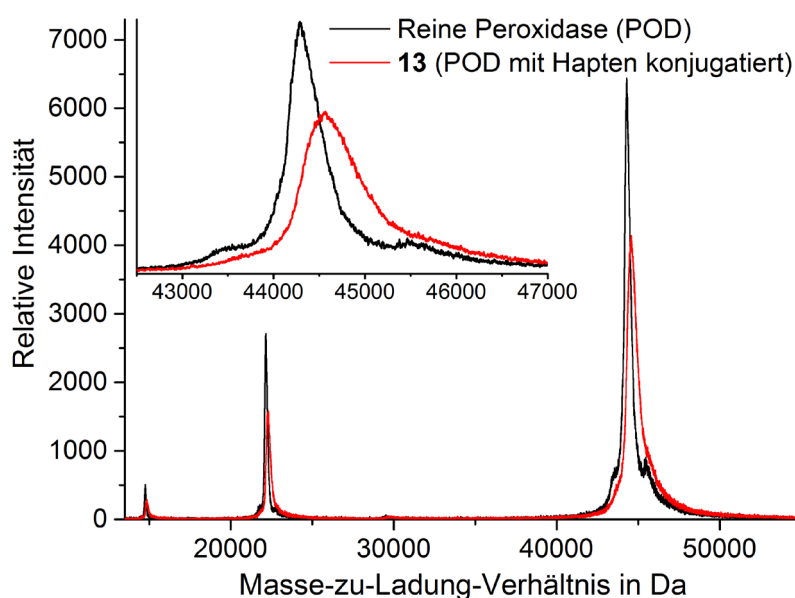


Abbildung 32: MALDI-TOF-Massenspektrum für den Tracer **13** und ungekoppelte Meerrettichperoxidase.

Es sind für Peroxidase und **13** drei Signale zu erkennen, welche unterschiedlichen Ladungszuständen zugeordnet werden können. Bei dem Signal mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von etwa 44300 Da handelt es sich um die einfach geladene

Peroxidase. Das Signal bei etwa 22150 Da ist der zweifach geladenen Spezies und das bei etwa 14765 Da der dreifach geladenen POD-Spezies zuzuordnen. Für den Tracer **13** wird, beim Vergleich des Signals zu der einfach geladenen Spezies der POD, eine mittlere Massenverschiebung zu einem höheren Massen-zu-Ladungs-Verhältnis von etwa 280 Dalton erhalten. Unter Berücksichtigung der Masse des Haptens von etwa 350 Da ergibt sich eine mittlere Kopplungsrate von 0,8 Hapten-Molekülen pro Peroxidase-Molekül. Dies ist in guter Näherung die typischerweise als ideal angenommene Kopplungsrate von 1.

Für die Kopplung von Hapten und BSA zur Darstellung eines Immunogens werden höhere Kopplungsraten als notwendig angesehen. Die erhaltenen Massenspektren von BSA und Immunogen **16** sind im Anhang in Abbildung A5 dargestellt. Aus der Verschiebung des Signalmaximums von etwa 2010 Da ergibt sich dabei eine mittlere Kopplungsrate von etwa 6 Hapten-Molekülen pro BSA-Molekül. Das Signal des Immunogens zeigte aber ein deutlich stärkeres Signaltailing als BSA. Beim Vergleich der Massen-zu-Ladungs-Verhältnisse bei 10 % der Signalthöhe ergab sich eine Kopplungsrate von etwa 11.

Der neue Tracer **13** wurde verwendet, um die Kreuzreaktivität von SMX-Metaboliten und von Sulfonamiden, die in Abwässern nachgewiesen werden konnten, zu messen. In Tabelle 8 sind die C-Werte und Kreuzreaktivitäten aufgeführt die bei Anwendung des alten und neuen Tracers erhalten wurden. Das neue Fmoc-entschützte Hapten **11** wurde auch vermessen.

Tabelle 8: *C-Werte der 4-Parameter-Gleichung in µg/L bei Anwendung des alten und neuen Tracers (Verdünnung) unter gleichen Bedingungen und sich dabei ergebene Kreuzreaktivität (KR) für verschiedene Sulfonamide, wobei Succ-SMX für N⁴-Succinimidyl-Sulfamethoxazol (Hapten des alten Tracers) und **11** für das Hapten des neuen Tracers steht*

Substanz	Alter Tracer (100 000-fach)		Neuer Tracer (500-fach)		Neuer Tracer (125-fach + Blocking)	
	C-Wert	KR in %	C-Wert	KR in %	C-Wert	KR in %
SMX	1,9		0,63		0,15	
Succ-SMX	0,18	1100	0,20	320	---	---
N ⁴ -Acetyl-SMX	0,31	610	0,20	320	0,049	310
4-Nitro-SMX	0,34	560	0,18	350	---	---
Sulfamethizol	0,68	280	0,54	120	0,094	160
Sulfachlorpyridazin	57	3,3	150	0,4	33	0,5
Sulfapyridin	1300	0,1	1200	< 0,1	4200	< 0,1
11	170	1,1	44	1,4	---	---

Bei Verwendung des neuen Tracers war eine deutlich höhere Konzentration an Tracer notwendig, um ähnliche Extinktionswerte (A-Wert) wie beim alten Tracer zu erhalten. Der neue Tracer musste etwa 1000-fach konzentrierter eingesetzt werden. Dies entsprach in Näherung auch der geringeren Kreuzreaktivität des neuen Haptens von 1,1 % im Vergleich zum für die Immunisierung und den alten Tracer verwendeten Haptens (Succ-SMX) mit 1100 %. Die benötigte hohe Konzentration des neuen Tracers war daher in dessen geringerer Bindungsaffinität zum Antikörper begründet. Dies zeigt auch die Grenzen eines heterologen Tracers auf, der immer noch eine ausreichend gute Bindungsaffinität zum Antikörper besitzen muss. Um einen möglichst sensitiven ELISA zu erhalten, wird versucht, die Konzentration an Antikörper und Tracer so gering wie möglich zu wählen. Je niedriger die notwendigen Konzentrationen an Antikörper und Tracer sind, desto niedriger ist die notwendige Konzentration an Analyt um das System zu stören und zur Signalveränderung zu führen. Die Konzentration an Antikörper und Tracer ist jedoch limitiert, da der gebundene Tracer noch ein ausreichend starkes Signal liefern muss. Da die Antikörperverdünnung durch den alten Tracer aus Gründen der Vergleichbarkeit feststand, wurde lediglich die Verdünnung des neuen Tracers maximal gewählt. Dabei zeigten sich noch akzeptable Extinktionswerte bei einer 500-fachen Verdünnung. Die erhaltenen A-Werte waren aber weniger als halb so hoch wie bei 100 000-facher Verdünnung des alten Tracers. Ein linearer Zusammenhang zwischen A-Wert und Konzentration des Tracers bestand nicht.

Bei Anwendung des neuen Tracers lagen die Kreuzreaktivitäten der an der N^4 -Position substituierten Stoffe etwa um den Faktor 2-3 niedriger. Auch die Kreuzreaktivitäten anderer Sulfonamide wurden mindestens halbiert. Lediglich für das neue Hapten stieg die Kreuzreaktivität an. Da dieses Hapten für die Synthese des neuen Tracers diente, war eine höhere Affinität der nun für den Assay herangezogenen Antikörper gegenüber dem Hapten **11** nicht überraschend. Neben der Absenkung der Kreuzreaktivität war, bis auf Ausnahmen, die Absenkung der erhaltenen C-Werte nennenswert. Die Empfindlichkeit des ELISAs für diese Verbindungen stieg an. Der Grund dafür lag wahrscheinlich in der geringeren Affinität der Antikörper zum neuen Hapten. Das neue Hapten zeigte eine geringere Bindungsaffinität als das alte Hapten und ließ sich daher schon durch geringere Konzentrationen stark bindender Stoffe wie SMX oder N^4 -Acetyl-SMX vom Antikörper verdrängen.

Anhand der hohen D-Werte der Kalibrierfunktionen bei Verwendung des neuen Tracers und deren Absenkung für einzelne Sulfonamide bei Messung hoher Konzentrationen kam der Verdacht auf, dass der Tracer eventuell unspezifisch an der Oberfläche binden könnte. Da die Tracer-Lösung nur schwach verdünnt werden

konnte, ergaben sich Peroxidase-Konzentrationen im mg/L-Bereich. Durch die katalytische Aktivität der POD, können jedoch schon niedrigste Konzentrationen im ng/L-Bereich nachgewiesen werden. Um eine unspezifische Adsorption von POD auszuschließen, wurde die mit Antikörpern beschichtete Platte, vor Auftragung des Tracers und der Standards, 30 min mit einer 1 %igen BSA-Lösung behandelt. Das BSA adsorbiert an der Platte und blockiert dadurch die Bindungsstellen an der die POD adsorbieren könnte. Durch diesen Blocking-Schritt sank der A- und D-Wert gleichermaßen ab. Dies war ein deutliches Indiz, dass es sich um einen Effekt unabhängig von der Analytkonzentration handelte. Zudem zeigten nun auch alle Kalibrierfunktionen einen ähnlichen D-Wert, der nicht durch höhere Analytkonzentrationen abgesenkt wurde. Durch diesen Blocking-Schritt wurde die Selektivität nicht signifikant verändert, jedoch sanken die C-Werte der Stoffe nochmals deutlich ab. Bei Anwendung des neuen Tracers und des Blocking-Schritts war der SMX-ELISA hinsichtlich SMX etwa um den Faktor 12 empfindlicher.

Der neue Tracer wurde mit einer Verdünnung von 1:500 und aus Gründen der Vergleichbarkeit ohne Blocking-Schritt zur Vermessung einer Abwasserprobe mittels SMX-LC-ELISA verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 33 gezeigt.

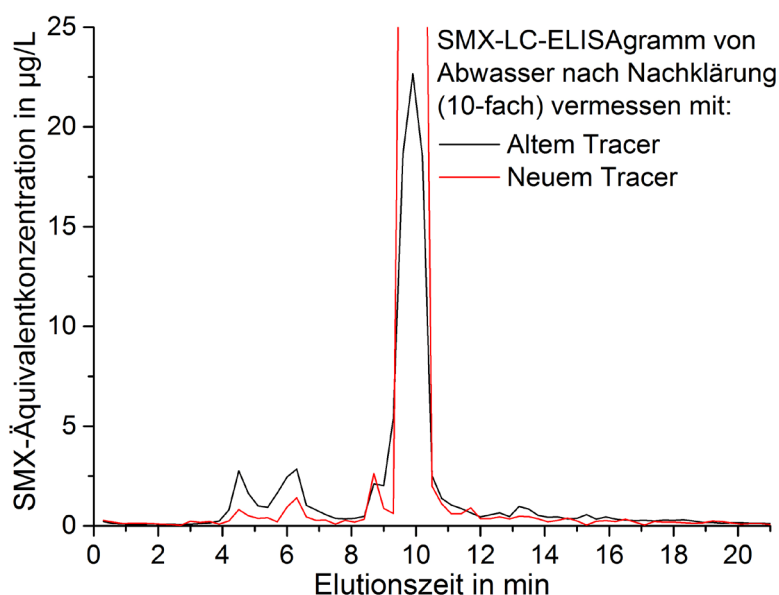


Abbildung 33: Überlagerung von SMX-LC-ELISAGrammen von Abwasser des Klärwerks Steinhäule nach Nachklärung bei 10-facher Anreicherung, gemessen mit dem alten und dem neuen Tracer unter Verwendung der HPLC-Methode 1.

Die erhaltenen SMX-LC-ELISAGramme waren sehr ähnlich. Für beide Tracer wurde wie erwartet ein ähnlich hohes SMX-Signal erhalten. Durch Anwendung des neuen Tracers konnten die Interferenzsignale bei ca. 4,5 min und 6 min etwa halbiert werden. Die Signalintensität des Interferenzsignals bei 10 min, welches wahr-

scheinlich auf unspezifische Interferenzen beruhte, stieg jedoch an. Der Grund dafür könnte in der geringeren Bindungsaffinität des neuen Tracers gelegen haben, welcher leichter von auch nur schwach an den Antikörper bindenden Stoffen verdrängt werden konnte. Dies führte zur Messung einer erhöhten SMX-Äquivalentkonzentration. Für beide Tracer wurde die Probe mit dem gleichen Anreicherungsfaktor vermessen. Der SMX-ELISA bei Verwendung des neuen Tracers war jedoch deutlich empfindlicher. Dadurch war auch der gut quantifizierbare Konzentrationsbereich zu niedrigeren Konzentrationen verschoben. Konzentrationen oberhalb von 25 µg/L lagen schon oberhalb dieses Bereichs und sind deshalb nicht dargestellt. Aufgrund der besseren Nachweisstärke könnte die Probe bei Vermessung mit dem neuen Tracer stärker verdünnt gemessen werden, was eventuell auch noch zu einer relativen Absenkung des Interferenzsignals bei 10 min führen könnte.

Es wurde ein neuartiger Typ eines SMX-Haptens entwickelt, wobei sich die Brücke zur Verknüpfung von Analyt und Protein nicht wie bisher an der N^4 -Position befindet oder durch Substitution des 5-Methylisoxazolrings erfolgt, sondern an der N^1 -Position. Daraus kann sich eine Selektivität von Antikörpern ergeben, die so bisher für Antikörper, welche gegen Sulfonamide gerichtet sind, nicht erreicht wurde. Das neuartige Hapten wurde an Peroxidase gekoppelt und als Tracer eingesetzt. Durch diesen neuen und heterologen Tracer konnten die Kreuzreaktivitäten von SMX-Metaboliten und anderen Sulfonamiden um den Faktor 2-3 gesenkt werden. Eine Eliminierung der Kreuzreaktivität war nicht möglich. Stoffe die eine hohe Kreuzreaktivität bei Anwendung des alten homologen Tracers zeigten, zeigten auch eine hohe Kreuzreaktivität bei Anwendung des heterologen Tracers. Dies ist eine Beobachtung die auch aus den Ergebnissen anderer Publikationen hervorgeht. Die Diversität der Analyt-selektiven polyklonalen Antikörper schien nicht so groß wie erwartet zu sein. Bei Verwendung des neuen Tracers, der eine deutlich geringere Bindungsaffinität aufweist als der alte, konnte die Empfindlichkeit des ELISAs für SMX um den Faktor 12 erhöht werden. Bei Anwendung des neuen Tracers im SMX-LC-ELISA zur Vermessung einer Abwasserprobe zeigte sich für einzelne Interferenzsignale eine Halbierung der SMX-Äquivalentkonzentration. Das intensivste Signal um 10 min konnte jedoch nicht reduziert werden. Darüber hinaus konnten unter Anwendung des neuen Tracers keine neuen Interferenzsignale erhalten werden. Das neuartige Hapten wurde auch an Rinderserumalbumin gekoppelt. Das erhaltene Konjugat zeigte auf Basis von MALDI-TOF-Messungen eine ausreichend hohe Kopplungsrate von Hapten-Molekülen pro BSA-Molekül und kann als Immunogen zur Gewinnung neuer und selektiverer Antikörper verwendet werden.

2.2.7 Vermessung von durch elektrochemischer Behandlung erhaltener Syntheseprodukte

Neben dem Versuch der Identifikation von Kreuzreaktanden aus natürlich belasteten Umweltproben, sollte auch der Versuch unternommen werden, potenzielle Kreuzreaktanden zu generieren. Dabei wurde der Analyt elektrochemisch behandelt, so dass Oxidations- oder Reduktionsprodukte entstehen konnten. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass die Analytkonzentration im Prinzip im Rahmen des Löslichkeitsprodukts beliebig hoch gewählt werden kann. Zudem kann die Matrix in der die Reaktionsprodukte vorliegen frei gewählt werden und so im Gegensatz zur Umweltprobe deutlich weniger komplex sein. Dieser Ansatz erhöht daher massiv die Chance gebildete Inhaltstoffe zu identifizieren. Es stellte sich jedoch die Frage, ob bei Verwendung der elektrochemischen Behandlung in einfacher Probenmatrix, Kreuzreaktanden gebildet werden, welche für Umweltproben relevant sind. Die Bildung von Transformationsprodukten kann bei diversen Reaktionen auftreten. Die Reaktionsprodukte sind aber in der Regel nur von Interesse, wenn sie auch in der Umwelt oder bei technischen Prozessen auftreten und toxikologische Auswirkungen auf die Umwelt haben. In dieser Arbeit stand nicht das toxikologische Potenzial, sondern das Potenzial als mögliche Interferenz zu wirken im Fokus. Eine gewisse Parallele kann dabei aber gezogen werden. Ein Stoff interferiert im ELISA aufgrund einer unerwünschten Bindung an den Antikörper. Bei den meisten toxisch wirkenden Substanzen binden diese unerwünscht an einen Rezeptor.

Die elektrochemische Behandlung wurde für SMX und E1 durchgeführt. Dafür wurden Lösungen von jeweils 10 mg/L SMX und Estron in einer Wasser-MeOH-Mischung verwendet. Unter reduktiven Bedingungen konnte für beide Analyten keine Bildung von Reaktionsprodukten mittels LC-MS detektiert werden. Unter oxidativen Bedingungen gelang dies jedoch. Die meisten Produkte wurden erhalten, wenn für SMX eine Spannung von 1,5 V und für Estron von 2,0 V verwendet wurde. Die beiden Standardlösungen wurden daher für 30 min bei den jeweiligen Spannungen behandelt. Anschließend wurden die erhaltenen Synthesemischungen mittels LC-ELISA vermessen. Aufgrund der hohen Analytkonzentrationen wurde die Synthesemischung, welche unter Verwendung des SMX-Standards erhalten wurde, unverdünnt und 500-fach verdünnt gemessen. Erst durch die starke Verdünnung konnten aussagekräftige SMX-LC-ELISAGramme erhalten werden. Für E1 wurden vergleichsweise niedrige Konzentrationen erhalten. Es schien, dass E1 nicht so stabil gegen die gewählten oxidativen Bedingungen war und stärker abgebaut wurde. Eine saure Hydrolyse mit 16 %iger HCl für 18 h führte auch zum vollständigen Abbau von E1 in den Realproben. In Abbildung 34 sind die erhaltenen UV-Chromatogramme

und LC-ELISAGramme für die Synthesemischungen nach elektrochemischer Behandlung der Standardlösungen gezeigt.

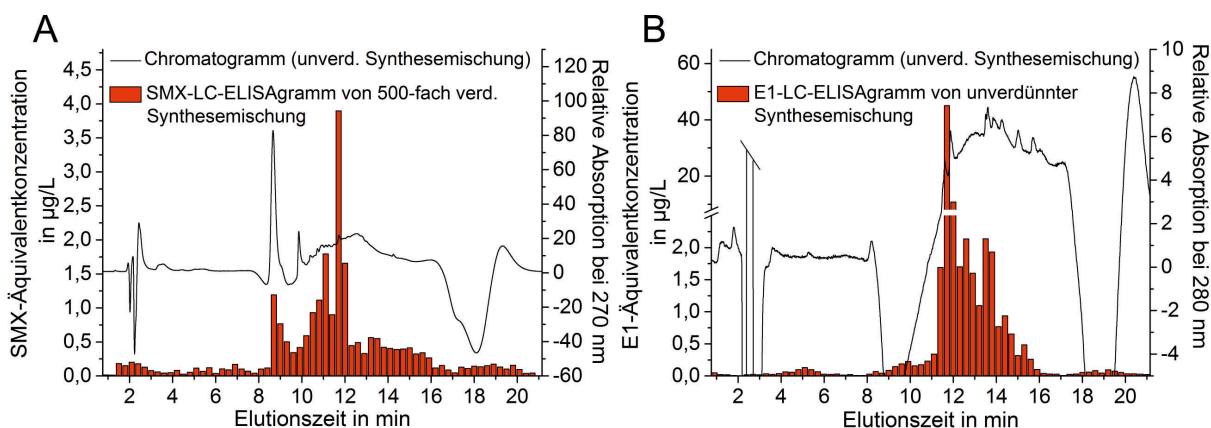


Abbildung 34: UV-Chromatogramme und LC-ELISAGramme nach oxidativer Behandlung von A) einem SMX-Standard fraktioniert unter Verwendung der HPLC-Methode 1 und B) einem Estron-Standard fraktioniert unter Verwendung der HPLC-Methode 2.

Im UV-Chromatogramm der Abbildung 34 A ist bei Vermessung der unverdünnten Synthesemischung deutlich das SMX-Signal um 8,7 min zu erkennen. Es war das intensivste UV-Signal bei Messung der Absorption bei 270 nm. Im SMX-LC-ELISAGramm war ebenfalls das Signal für SMX gut zu erkennen. Im Elutionszeitbereich von 10-16 min war die Grundlinie erhöht. Die erhaltenen Äquivalentkonzentrationen lagen deutlich höher als in einer Leerprobe und waren für die 500-fach höher konzentrierte unverdünnte Synthesemischung noch deutlich stärker. Es handelte sich bei den Signalen in diesem Bereich um Interferenzsignale. Signifikante schmale Signale waren nur bei 11,1 min und 11,7 min zu erkennen. Mittels LC-MS konnte unter Verwendung des positiven Ionisationsmodus ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 335 zu der Elutionszeit von etwa 11,1 min detektiert werden. Größeres Interesse sollte aber dem Signal bei 11,7 min zukommen. Die Äquivalentkonzentration war im Vergleich zum SMX-Signal 3-fach erhöht, aber die UV-Signalintensität entsprach nur etwa 3 % derer des SMX. Unter der Annahme das SMX und der Stoff der bei 11,7 min eluiert den gleichen molaren Extinktionskoeffizienten bei 270 nm besaßen, ergäbe sich eine Kreuzreaktivität von etwa 10 000 %. Der Stoff bei 11,7 min würde eine 100-fach höhere Kreuzreaktivität besitzen als SMX. Bei der Elutionszeit von 11,7 min, konnte mittels LC-MS ein Signal mit einem m/z -Verhältnis von 503 detektiert werden. Dieses m/z -Verhältnis liegt 249 Da höher als das von SMX. Bei Fragmentierung dieses Signals wurden unter anderem Fragmente mit einem m/z -Verhältnis von 341, 357 und 405 detektiert, welche den SMX-Fragmenten 92, 108, 156 mit einer Verschiebung von ebenfalls

249 Da entsprechen. Dies könnte ein Indiz sein, dass es sich um ein SMX-Derivat handelte. Die intensivsten Fragmente hatten jedoch einen Verlust an m/z-Verhältnis von 64, 91, 183 und 237 Da im Vergleich zum Quasi-Molekülion mit 503 Da. Eine Zuordnung der Massenverluste an eine entsprechende Fragmentierung oder eine Identifikation der Substanz gelang nicht.

Im E1-LC-ELISAGramm war neben dem E1-Signal bei 11,7 min und dem erhöhten Untergrund von etwa 9-16 min ein weiteres diskretes Signal bei etwa 14 min zuerkennen. Dieses Signal führte zu einer deutlich geringeren Äquivalentkonzentration als das E1-Signal, lieferte aber ein ähnlich intensives UV-Signal. Man beachte dabei die Unterbrechung der y-Achse und unterschiedliche Skalierung. Unter der Annahme, dass das Signal im E1-LC-ELISAGramm bei 14 min auch dem UV-Signal bei 14 min zuzuordnen war, ergab sich eine sehr geringe Kreuzreaktivität.

Es wurden Standard-Lösungen von SMX und E1 oxidativ behandelt. Die für die elektrochemischen Synthesen verwendete Spannung, wurde in der Art gewählt, dass möglichst viele Produkte mittels LC-MS detektiert werden konnten. Eine Quantifizierung der entstandenen Produkte war nicht möglich, aber es ist nicht anzunehmen, dass alle Reaktionsprodukte in gleichem Maße gebildet wurden. Für SMX wurden zwei signifikante Signale bei etwa 11,1 min und 11,7 min und für E1 bei etwa 14 min im jeweiligen LC-ELISAGramm erhalten. Zudem wurde in beiden LC-ELISAGrammen ein breites und wenig intensives Untergrundsignal im Bereich von 10-16 min erhalten. Zu den entsprechenden Elutionszeiten der schmalen Signale wurde jedoch in keiner Umweltprobe ein Interferenzsignal gemessen. Die durch die elektrochemische Synthese dargestellten Kreuzreaktanden schienen in den Umweltproben nicht vorzuliegen. Interferenzen die in den Umweltproben auftraten, wie der SMX-Metabolit *N*⁴-Acetyl-SMX oder das SMX-Konjugat mit einer Elutionszeit um 6 min, wurden durch die elektrochemische Synthese nicht gebildet. Die elektrochemische Synthese oder allgemein andere Synthesereaktionen wie UV-Bestrahlung oder der Einsatz von Oxidationsmitteln können zur Identifizierung von Transformationsprodukten beitragen, da die Analytkonzentration und Matrix nahezu frei gewählt werden kann. Die Nachbildung umweltrelevanter Transformationsprodukte ist dadurch aber nur eingeschränkt möglich. Die in komplexen aquatischen Systemen oder in Lebewesen ablaufenden Transformationen eines Stoffes lassen sich nur eingeschränkt unter einfachen Bedingungen nachstellen.

2.3 Anwendung der Massenspektrometrie zur Identifizierung von Interferenzen beim ELISA

Der LC-ELISA kann genutzt werden, um Interferenzsignale zu detektieren und gegebenenfalls zwischen spezifischen und unspezifischen Interferenzen zu unterscheiden. Er ermöglicht jedoch keine sichere Identifizierung von Stoffen. Dazu wurde die Massenspektrometrie mit Kopplung an ein HPLC-Gerät verwendet. Zur Selektivitätssteigerung und sicheren Identifizierung bietet sich dabei die hochauflösende Massenspektrometrie oder die Tandem-Massenspektrometrie an. Beide Verfahren kamen innerhalb dieser Arbeit zum Einsatz. Es wurde aber bei Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie für SMX eine etwa 100-fach höhere Nachweisempfindlichkeit und für E1 deutlich bessere Nachweisstärke von mehr als Faktor 100 erhalten. Aus diesem Grund war fast ausschließlich die Tandem-Massenspektrometrie unter Verwendung eines Triple-Quadrupol-Massenspektrometers zielführend. Es sollte zur sicheren Quali- und Quantifizierung eines Stoffes, unter Verwendung eines authentischen Referenzstandards, der Target-Screening-Ansatz durchgeführt werden. Des Weiteren sollte auch der Suspected-Target-Screening-Ansatz zum Einsatz kommen. Beim Suspected-Target-Screening-Ansatz werden potenzielle Kreuzreaktanden simuliert und deren zu erwartende MRM-Übergänge, bei analoger Fragmentierung wie der Zielanalyt, errechnet.

2.3.1 Target-Screening

Für das Target-Screening wurden Sulfonamide ausgewählt, welche in Vorversuchen eine Kreuzreaktivität zeigten. Viele der Sulfonamide wie auch SMX-Metaboliten konnten in den Umweltproben jedoch nicht nachgewiesen werden. Es muss erwähnt werden, dass nur für SMX eine Optimierung der Messparameter durchgeführt wurde. Da die Sulfonamide und SMX-Metaboliten dem SMX strukturell sehr ähnlich sind, ist anzunehmen, dass auch sie bei diesen gewählten Parametern gut nachweisbar sind. Die genauen Nachweisgrenzen wurden nicht ermittelt und eine Quantifizierung für die nachgewiesenen Stoffe mit niedriger Kreuzreaktivität wurde ebenfalls nicht durchgeführt. In Tabelle 9 sind die nachgewiesenen Sulfonamide aufgeführt.

Ein Stoff galt als nachgewiesen, wenn er die in der Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission gestellten Anforderungen erfüllte. Die ermittelte Elutionszeit durfte nicht mehr als 2,5 % von der des Referenzstandards abweichen. Für den Stoff mussten mindestens 2 MRM-Übergänge positiv sein. Im Vergleich zum Referenzstandard durften die Intensitäten des MRM-Übergangs für Übergänge mit einer relativen Intensität zum intensivsten Übergang von > 50 % um bis zu 20 %

abweichen und bei einer relativen Intensität von 20-50 % um bis zu 25 % variieren. Als sicher nachgewiesen werden in Tabelle 9 Stoffe bezeichnet, welche ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis (S/N-Verhältnis) von größer 6 zeigten. Als Nachweisgrenze wurde ein S/N-Verhältnis von 3 gewählt. Wenn dieses S/N-Verhältnis nicht für mindestens 2 MRM-Übergänge erreicht wurde, galt der Stoff als nicht nachgewiesen.

Tabelle 9: *Mittels LC-MS/MS unter Vergleich zu einem Referenzstandard nachgewiesene Sulfonamide mit Angabe derer Kreuzreaktivität (KR) und deren Auftreten in unterschiedlichen Umweltwasserproben*

Substanz	KR in %	Klärwerkszulauf					
		1	2	3	4	5	6
Sulfamethoxazol in ng/L	100	3200	870	730	850	620	370
<i>N</i> ⁴ -Acetyl-SMX in ng/L	610	1100	2500	2100	2300	1300	1200
Sulfadiazin	0,5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfadimidin	0,3	✓	✗	✗	✓	✗	✓
Sulfapyridin	0,1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfamerazin	< 0,1	✓	✓	✗	✗	✓	✗
	KR in %	Klärwerksablauf					
		1	2	3	4	5	6
Sulfamethoxazol in ng/L	100	2200	220	190	300	210	110
<i>N</i> ⁴ -Acetyl-SMX in ng/L	610	160	120	78	56	40	150
Sulfadiazin	0,5	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfadimidin	0,3	✓	✗	✗	✓	✗	✓
Sulfapyridin	0,1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfamerazin	< 0,1	✓	✗	✗	✗	✗	✗
	KR in %	Oberflächenwasser					
		1	2	3	4	5	6
Sulfamethoxazol in ng/L	100	120	83	50	150	200	24
<i>N</i> ⁴ -Acetyl-SMX in ng/L	610	✓(< 1)	✗	✗	✗	✓(< 1)	✗
Sulfadiazin	0,5	NWG	✗	NWG	✓	✓	✗
Sulfadimidin	0,3	✗	✗	✗	NWG	✗	✗
Sulfapyridin	0,1	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Sulfamerazin	< 0,1	NWG	✓	✓	NWG	NWG	✓

✓ - sicher nachweisbar ✗ - nicht nachweisbar NWG - an der Nachweisgrenze

Die Messergebnisunsicherheiten sind aufgrund der besseren Übersichtlichkeit nicht aufgeführt. Die mittlere relative Standardabweichung der Doppelbestimmung lag für Sulfamethoxazol bei 2 % und für *N*⁴-Acetyl-SMX bei um 5 %. Der Grund für die deutlich höhere relative Standardabweichung für *N*⁴-Acetyl-SMX liegt vermutlich darin, dass das als interner Standard verwendete d4-SMX eine Minute früher als *N*⁴-Acetyl-SMX eluierte und daher keinen optimalen internen Standard darstellte. Von den nachgewiesenen Sulfonamiden zeigte nur *N*⁴-Acetyl-SMX eine Kreuzreaktivität, welche einen signifikanten Einfluss auf die Quantifizierung haben könnte. Die

Konzentrationen von *N*⁴-Acetyl-SMX waren in den Zulaufen, bis auf Zulauf 1, mit etwa Faktor 3 deutlich höher als die Konzentrationen von SMX. Dies ist nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass nach Metabolisierung von SMX im menschlichen Körper der Anteil an *N*⁴-Acetyl-SMX etwa 4-fach höher ist als der des unveränderten SMX. In den behandelten Abwässern wurde eine deutlich geringere Konzentration an SMX, nur etwa ein Drittel des Zulaufwertes, ermittelt. Die gemessenen SMX-Konzentrationen und die errechneten Abbauraten sind ähnlich denen in der Literatur [101,60]. Durch die Abwasserbehandlung wurde die Konzentration an *N*⁴-Acetyl-SMX mit etwa Faktor 10 deutlich stärker, als die von SMX, reduziert. In Oberflächengewässern war die Konzentration an *N*⁴-Acetyl-SMX noch niedriger. Im Teltowkanal, nahe dem Auslass des Klärwerksablaufs des Klärwerks Waßmannsdorf, konnte *N*⁴-Acetyl-SMX nur in deutlich geringeren Konzentrationen nachgewiesen werden. Die genaue Bestimmungsgrenze von *N*⁴-Acetyl-SMX in Oberflächenwasser wurde nicht ermittelt, aber sie lag in guter Näherung für die angereicherten Proben bei etwa 1 ng/L. Sulfamethoxazol konnte hingegen in den Oberflächengewässern noch sicher quantifiziert werden und zeigte deutlich höhere Konzentrationen und einen deutlich geringeren Konzentrationsabfall im Vergleich zu den Klärwerksablaufproben. Dies deutete darauf hin, dass *N*⁴-Acetyl-SMX in Oberflächengewässern stark abgebaut wurde. Bei Messungen von zu einem früheren Zeitpunkt gesammelten Umweltproben konnte Sulfathiazol (KR: 1,4 %) in Abläufen und Sulfadimethoxin (KR: < 0,1 %) in einem Zulauf nachgewiesen werden. Die Signalintensitäten lagen jedoch im Bereich der Nachweisgrenzen. Interessant war das Verhalten von Sulfachlorpyridazin (KR: 3,2 %). Es konnte in früheren Messungen in zwei Zulaufen nachgewiesen werden, jedoch nur, wenn diese nicht mittels SPE angereichert wurden. Die Wiederfindung von Sulfachlorpyridazin musste bei Verwendung der Strata-X-Kartuschen so gering sein, dass selbst eine 100-fache Anreicherung nicht mehr ausreichte um den vorher gut nachweisbaren Stoff noch nachweisen zu können. Sulfachlorpyridazin ist ein Beispiel, dass es möglich ist, Kreuzreaktanden mittels SPE-Behandlung abzutrennen.

Mittels Target-Screening konnte lediglich *N*⁴-Acetyl-SMX als potenter Kreuzreaktand nachgewiesen werden. Andere SMX-Metaboliten waren nicht nachweisbar. Weitere detektierte Sulfonamide zeigten nur eine geringe Kreuzreaktivität und scheiden aufgrund dessen und ihrer Elutionszeit als mögliche Ursachen für die Interferenzsignale im SMX-LC-ELISAGramm aus. *N*⁴-Acetyl-SMX war besonders in Zulaufproben in hohen Konzentrationen nachweisbar. Es kann jedoch durch eine Behandlung mit HCl gespalten und zu SMX umgesetzt werden, wie in Kapitel 2.2.3 gezeigt wurde. Der Stoff der bei 6 min eluierte und ebenfalls durch saure Hydrolyse zu SMX umgesetzt werden konnte, konnte im Rahmen des Target-Screenings nicht

identifiziert werden. Für die Ermittlung von potenziellen Kreuzreaktanden im Estron-ELISA konnte mittels LC-MS/MS nur Estradiol-16-on detektiert werden. Dieses wies eine Kreuzreaktivität von 0,1 % und eine Signalintensität nahe der Nachweisgrenze auf. Es ist daher als potenzieller Kreuzreaktand auszuschließen. Für das Target-Screening von E1-Kreuzreaktanden ist zu sagen, dass die sehr niedrigen Konzentrationen und schlechte Ionisierbarkeit der Hormone bei Anwendung von Elektrospray-Ionisation (ESI) einen Nachweis von Kreuzreaktanden deutlich erschwerte.

2.3.2 Suspected-Target-Screening

Da unter Anwendung des Target-Screenings, wie zu erwarten, nicht alle Interferenzsignale einer Verbindung zugeordnet werden konnten, kam auch der Suspected-Target-Screening-Ansatz zum Einsatz. Typischerweise wird dabei mit einem Vergleich von in Datenbanken vorhandenen Einträgen gearbeitet. Die Datenlage von bekannten Metaboliten ist im Falle von Sulfamethoxazol sehr eingeschränkt und alle in diversen Datenbanken eingetragenen Verbindungen wurden schon im Target-Screening untersucht. Daher wurde für SMX und E1 eine andere Art und Weise des Suspected-Target-Screenings gewählt, welche eine größere Vielfalt an Metaboliten zulässt. Es wurden die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse und MRM-Übergänge von literaturbekannten, aber in Datenbanken nicht hinterlegten, Transformationsprodukten errechnet. Für die MRM-Übergänge wurde eine Fragmentierung analog zu SMX bzw. E1 angenommen. Es wurden darüber hinaus aufbauend auf typischen und seltenen Phase-I- und Phase-II-Reaktionen auch die Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse möglicher Metaboliten errechnet. Dabei wurden folgende spekulative Metaboliten in Betracht gezogen: Methyl-, OH-, (NO)-, (NO₂)-, (Acetyl)-, (SO₄)-, (SO₃)-, (Glycin)-, (Epoxid)- und Glucuronsäure-Analyt sowie deren doppelte Metabolisierung, eine Kombination aus verschiedenen Metabolisierungen und eine Metabolisierung an unterschiedlichen Positionen im Molekül. Durch diesen Suspected-Target-Screening-Ansatz ergab sich auf der Suche nach SMX-Kreuzreaktanden eine Messmethode die neben den für Standards bekannten MRMs auch eine Vielzahl an spekulativen MRMs beinhaltete. Es wurden in der LC-MS/MS-Methode insgesamt 192 MRM-Übergänge gleichzeitig erfasst und so parallel nach 77 verschiedenen Stoffen gesucht. Neben den in Tabelle 9 aufgeführten Stoffen erfüllte jedoch nur ein potenzieller Stoff die Anforderungen an eine sichere Identifizierung. 3 positive MRM-Übergänge konnten für das vermutete („suspected“) SMX-*N*⁴-Glucuronid (SMX-*N*⁴-Glc) erhalten werden. Eine Glucuronidierung an der *N*⁴-Position analog zur Acetylierung erscheint logisch, ein Nachweis dieses Metaboliten war in der Literatur jedoch nicht beschrieben. Lediglich

das SMX- N^1 -Glucuronid ist literaturbekannt. Die MRM-Übergänge des vermuteten SMX- N^4 -Glucuronid waren in allen Abläufen und allen Oberflächenwasserproben nachweisbar. Da die Elutionszeit von SMX- N^4 -Glc mit der von N^4 -Acetyl-SMX zusammenfiel, war eine Korrelation von Signalintensität im SMX-LC-ELISAGramm und der Signalintensität, gemessen mittels LC-MS/MS, für die Ablaufproben nicht möglich. Wie aus Tabelle 9 hervorgeht, war der Gehalt an N^4 -Acetyl-SMX in den Oberflächenwasserproben jedoch vernachlässigbar klein. Für diese Proben konnte eine Korrelation aufgestellt werden, welche in Abbildung 35 gezeigt ist.

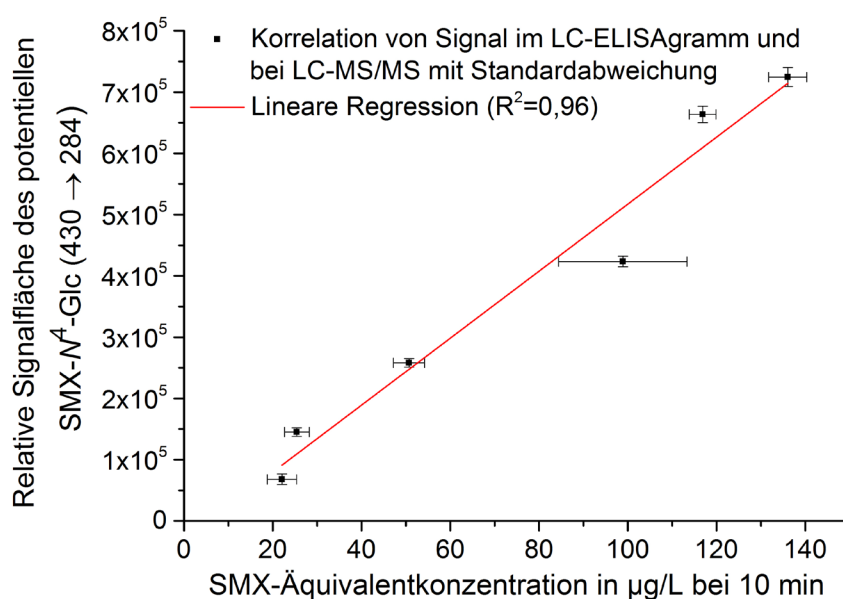


Abbildung 35: Korrelation von SMX-Äquivalentkonzentration für das Signal im LC-ELISAGramm bei der Elutionszeit um 10 min unter Verwendung der HPLC-Methode 1 und die gemessene Signalintensität des intensivsten MRM-Übergangs des potentiellen SMX- N^4 -Glucuronid.

Das vermutete SMX- N^4 -Glc zeigte bei 9,9 min die MRMs 430 → 332, 284 und 268 mit relativen Signalintensitäten von 6:10:8. Die zu erwartende exakte Masse konnte mittels Orbitrap (Exactive Plus, Thermo Fischer) mit einer Abweichung von unter 3 ppm detektiert werden. Bei der Auftragung der gemessenen Signalintensitäten in den LC-ELISAGrammen und mittels LC-MS/MS konnte eine gute Korrelation erhalten werden. Die bisherigen aufgeführten Ergebnisse sprachen alle für das Vorhandensein des SMX- N^4 -Glc, aber eine Korrelation ist kein Beweis. Ein Stoff kann nur bestätigt werden, wenn seine Struktur als Reinsubstanz mittels verschiedener Strukturaufklärungsmethoden identifiziert wird oder wenn ein authentischer Vergleichsstandard vorhanden ist. Für SMX- N^4 -Glc war dieser zum damaligen Zeitpunkt kommerziell nicht erhältlich. Daher wurde es durch Umsetzen von SMX mit Acetobromo- α -D-glucuronsäuremethylester in Gegenwart von Silbercarbonat in einer Koenigs-Knorr-Reaktion und anschließender Verseifung

dargestellt. Die erhaltene Reaktionsmischung wurde aufgrund der niedrigen Ausbeute nicht aufgereinigt. Das erhaltene SMX-*N*⁴-Glc zeigte die MRM-Übergänge 430 → 332, 284, 268 mit relativen Signalintensitäten von 25:7:17 bei einer Elutionszeit von 3,4 min. Es wurde auch das durch die verschiedenen Fragmente identifizierbare SMX-*N*¹-Glc erhalten. Es zeigte die MRM-Übergänge 430 → 156, 108, 92 mit relativen Signalintensitäten von 5:1:1 bei einer Elutionszeit von 3,7 min. In einer früheren Arbeit wurde das kommerziell erhältliche SMX-*N*¹-Glc mittels einer anderen HPLC-Methode und Phen-Säule vermessen. SMX-*N*¹-Glc aus dem hier beschriebenen Reaktionsansatz lieferte unter den gleichen Bedingungen eine vergleichbare Elutionszeit wie davor der Referenzstandard. Die Ausbeute, gemessenen am UV-Signal im Vergleich zu SMX, betrug für beide *N*-Glucuronide unter 1 %. Aus dem Wissen der eingesetzten Edukte, Reaktionsbedingungen, erhaltenen UV-Absorptionsspektren, Elutionszeiten und detektierten MRM-Übergänge wurden die beiden SMX-*N*-Glc-Verbindungen, auch ohne Einsatz der Kernspinresonanzspektroskopie, als identifiziert angenommen. Beide SMX-*N*-Glc-Verbindungen konnten in keiner Umweltprobe mittels LC-MS/MS nachgewiesen werden. Zudem wurde bei den entsprechenden Elutionszeiten kein Interferenzsignal im SMX-LC-ELISAGramm erhalten.

Aus der erfolgreichen sauren Hydrolyse (Kapitel 2.2.3) und das Verdünnungsexperiment (Kapitel 2.2.4) ging hervor, dass es sich bei dem Signal um 6 min im SMX-LC-ELISAGramm der Ablaufprobe 1 höchstwahrscheinlich um einen bisher unbekannten SMX-Metaboliten handelte. Ziel war es diesen SMX-Metaboliten, aufgrund seiner vermutlich hohen Kreuzreaktivität, zu identifizieren. Prinzipiell gibt es drei verschiedene Formen für den SMX-Metaboliten, welche in Abbildung 36 dargestellt sind.

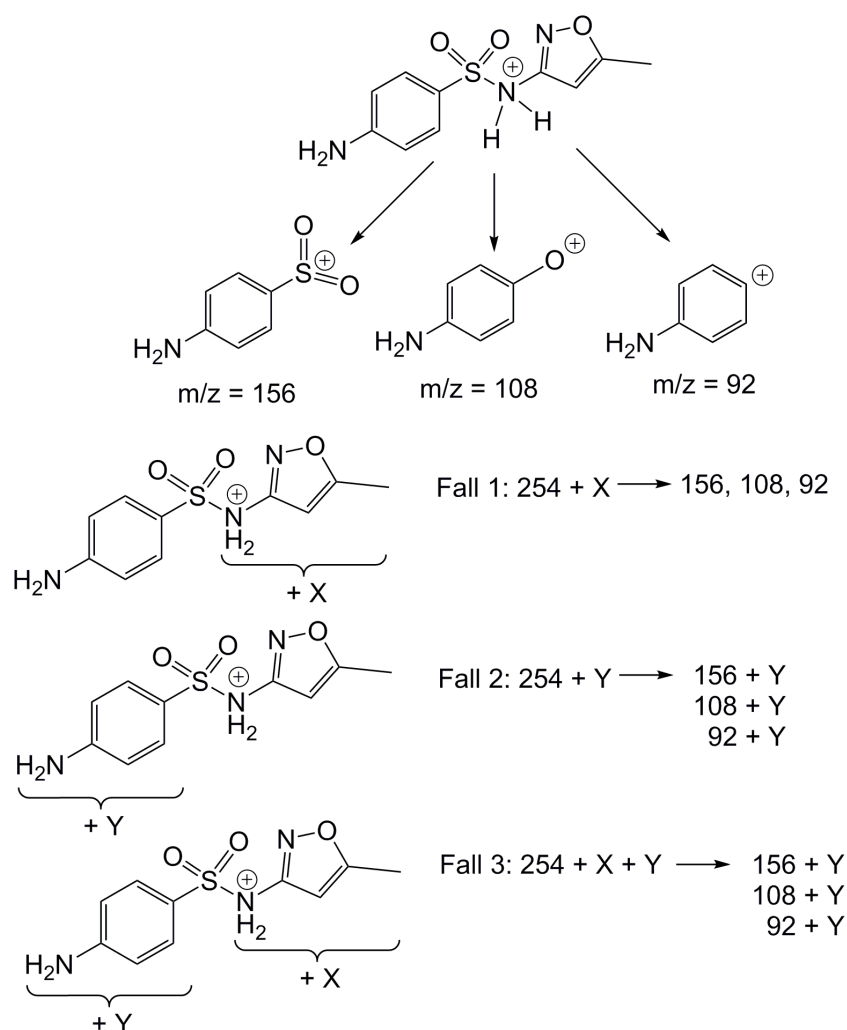


Abbildung 36: Darstellung von Fragmenten nach der Fragmentierung von SMX [102] sowie drei mögliche Fälle der Metabolisierung und daraus hervorgehende Fragmente.

Die Metabolisierung oder Veränderung des SMX kann wie in Fall 1 auf der Seite der Sulfonamidbindung vorliegen, welche später nicht den Produkt-Ionen m/z 92, 108 und 156 zugeordnet werden kann. Dieser Fall kann gut vermessen werden, indem Quasi-Molekülonen gemessen werden, welche bei Fragmentierung die Produkt-Ionen m/z 92, 108 und 156 bilden. Ein Beispiel für so einen Fall wäre das Sulfonamid Sulfapyridin, welches in allen Umweltproben nachgewiesen werden konnte.

Im Fall 2 erfolgt die Substitution auf dem Fragment des SMX, welches nach der Fragmentierung noch die Ladung trägt und gemessen wird. Es handelt sich damit um SMX mit einer Veränderung des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses, welches für das Molekülon und die Produkt-Ionen gleich groß ist. Dieser Fall kann ebenfalls gut detektiert werden, da es im Fall 2 bei Fragmentierung des unbekannten Stoffs zum selben Neutralverlust kommt wie für SMX. Es bestehen also für den Stoff dieselben

Differenzen des m/z -Verhältnisses von Quasi-Molekülion zu Produkt-Ionen wie für SMX. Ein Beispiel für Fall 2 wäre N^4 -Acetyl-SMX. Denkbar ist auch eine Metabolisierung an der Sulfongruppe, dies wäre ein Grenzfall zwischen Fall 1 und 2. Dieser würde jedoch auch zum Produkt-Ion m/z 92 und gegebenenfalls m/z 108 führen und wäre damit zumindest mit einem Signal in einem der verwendeten Messmodi für Fall 1 oder Fall 2 enthalten.

Der dritte Fall ist nicht mehr direkt lösbar. Dabei erfolgt eine Substitution auf der Seite der Sulfonamidbindung, welche den Fragmenten zuzuordnen ist sowie auf der Seite die dem Neutralverlust zuzuordnen ist. Es verändert sich also das m/z -Verhältnis der Produkt-Ionen und um einen anderen Wert das m/z -Verhältnis des Quasi-Molekülions. Dieser Fall wäre höchstens durch systematische Änderung von m/z -Verhältnissen von Quasi-Molekülionen möglich. Man müsste für jede nominale Masse das Produkt-Ionen-Spektrum aufnehmen und in diesem nach Produkt-Ionen suchen, welche eine m/z -Differenz wie die Produkt-Ionen von SMX aufweisen. Dieses Experiment ist theoretisch durchführbar, aber mit einem großen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand verbunden. Das Verfahren kann sich als deutlich komplexer erweisen, wenn es bei der Fragmentierung des Quasi-Molekülions zu Produkt-Ionen zu einem Wechsel der Ladungszahl kommt. In diesem Fall kann das m/z -Verhältnis eines Produkt-Ions höher als das des Quasi-Molekülions sein. Außerdem können auch die gebildeten Produkt-Ionen unterschiedliche Ladungszahlen tragen, was dazu führt, dass der oben beschriebene Ansatz der systematischen Änderung des vermessenden Quasi-Molekülions versagt. In diesem Fall sind auch die m/z -Verhältnisunterschiede der Neutralverluste nicht mehr analog zu SMX. Es ist auch vorstellbar, dass unterschiedliche Addukte wie H^+ und Na^+ zur Ladung der Produkt-Ionen führen. Bei Mehrfachladungen der Produkt-Ionen ist auch in diesem Bereich noch mit einer Varianz zu rechnen. Mehrfachladungen auch unter Verwendung von ESI sind besonders für größere Moleküle wie Peptide typisch. Um den Fall 3 zu untersuchen wurde die Probe im Fullscan-Modus vermessen. Daher können zumindest die Quasi-Molekülionen erfasst werden. Jedoch ist die Selektivität und damit Nachweisstärke im Fullscan-Modus deutlich schlechter.

Um einen sinnvollen Anreicherungsfaktor für die Messungen zu wählen, wurde nach der HPLC und vor dem Massenspektrometer ein T-Stück eingebaut. Durch dieses T-Stück wurde mittels Spritzenpumpe kontinuierlich SMX zu dem Eluat nach der HPLC hinzudotiert. Es war dadurch möglich, permanent den Matrixeffekt auf die SMX-Signalintensität, vorrangig Signalsuppression, zu beobachten. Bei der Elutionszeit um 6 min und einem Anreicherungsfaktor der Ablaufprobe 1 von 500, betrug die Signalsuppression etwa 40 %.

Der gleiche Aufbau wurde auch zur Beobachtung des Matrixeffektes auf die Estron-Signalintensität durchgeführt. Dabei wurde erkannt, dass bei Verwendung einer 2000-fachen Anreicherung zu bestimmten Elutionszeiten eine Signalsuppression von nahezu 100 % auftrat. Sehr hohe Anreicherungsfaktoren sind daher keine sinnvolle Wahl, um Spurenstoffe leichter nachzuweisen.

Für die Messungen zur Identifizierung des SMX-Metaboliten wurde die Ablaufprobe 1 mit einer 500-fachen Anreicherung vermessen. Es wurde für die verschiedenen Messmodi im Massenbereich von 50-800 Da gemessen. Zudem wurden bei den jeweiligen Modi auch das mögliche Vorliegen einer zweifach geladenen Molekülspezies und eine Adduktbildung mit H^+ und Na^+ berücksichtigt. Dass dieses Konzept zielführend sein kann, ist im Anhang in Abbildung A6 zusehen. Dabei konnte Sulfapyridin mit allen 3 erwarteten Signalen wiedergefunden werden, welche auch im Gesamtspektrum durch ihre hohe Signalintensität hervorstechen. N^4 -Acetyl-SMX konnte ebenfalls erkannt werden, jedoch waren nur 2 der 3 erwarteten Signale deutlich im Gesamtspektrum erkennbar. Da die Molarität des unbekannten Stoffes im Bereich von N^4 -Acetyl-SMX lag, sollte auf der Suche nach potentiellen Stoffen nicht nur auf Stoffe untersucht werden, welche alle drei erwarteten Signale lieferten.

Es wurden allgemein alle signifikanten m/z-Verhältnisse im Bereich einer Elutionszeit von 5,5-6,5 min berücksichtigt. Unter Verwendung der verschiedenen Messmodi wurden in Summe 74 MRM-Übergänge im positiven und 43 Übergänge im negativen Ionisationsmodus erhalten, welche ein vom Untergrund verschiedenes Signal lieferten. Die Ablaufprobe 1 wurde fraktioniert und die Fraktion von 5,5-6,5 min auf einen Gehalt von 5 % HCl angesäuert. Während der Inkubation der Fraktion mit HCl wurden die jeweiligen MRMs mittels LC-MS/MS gemessen. Die erhaltenen Signalintensitäten wurden zu dem Wert zum Zeitpunkt $t = 0$ min ins Verhältnis gesetzt und gegen die Inkubationszeit aufgetragen (Abbildung 37). Es zeigten mehrere MRM-Übergänge einen deutlichen Intensitätsanstieg. Dabei handelt es sich zum einen um $254 \rightarrow 92$, welcher SMX im positiven Ionisationsmodus repräsentiert und $252 \rightarrow 156$, welcher für SMX im negativen Ionisationsmodus erhalten wurde. Für wenige MRM-Übergänge wurde ein relativer Anstieg der Signalintensität gemessen. Die meisten MRM-Übergänge veränderten sich nicht signifikant in ihrer Signalintensität. Eine Abnahme der Signalintensität wurde nur für wenige Massenübergänge beobachtet. Von diesen zeigten viele eine andere Kinetik der Signalintensitätsabnahme im Vergleich zur Signalintensitätszunahme des SMX-Signals. Die Reaktionsordnung der Bildung von SMX war nicht bekannt, aber eine einfache saure Hydrolyse und damit proportionale Korrelation war am wahrscheinlichsten. Diese direkte Korrelation wurde lediglich für 3 MRM-Übergänge

erhalten, wie in Abbildung 37 B dargestellt ist. Diese MRM-Übergänge waren in den anderen Klärwerksablaufproben ebenfalls nachweisbar, jedoch in ähnlicher Intensität auch in den Klärwerkszuläufen. Da das Interferenzsignal im SMX-LC-ELISAGramm bei ca. 6 min nur in den Ablaufproben detektierbar war, konnten die 3 MRM-Übergänge für das Interferenzsignal bei 6 min ausgeschlossen werden.

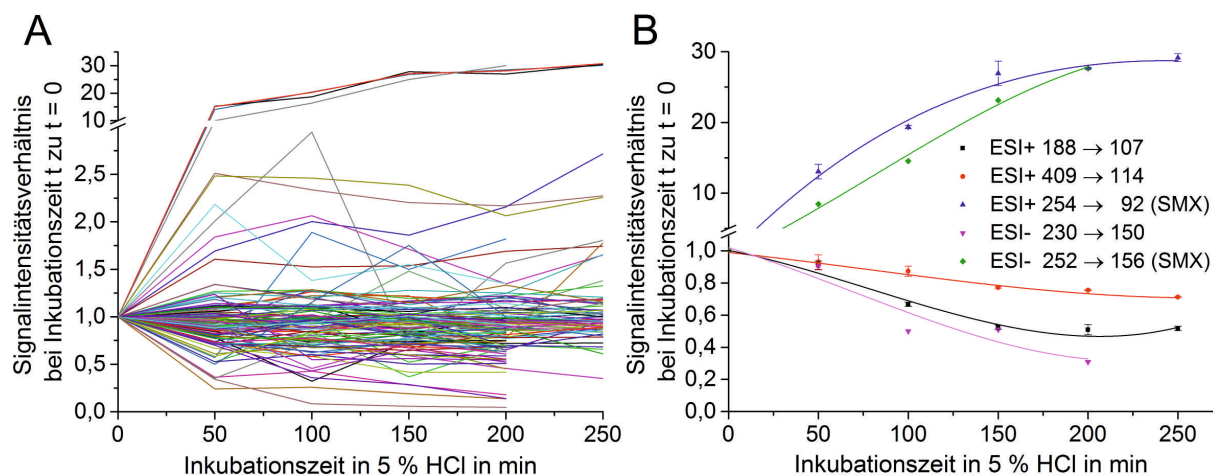


Abbildung 37: (A) Darstellung von Signalintensitäten von MRM-Übergängen im positiven (74) und negativen (43) Ionisationsmodus, welche zur Intensität zum Zeitpunkt $t=0$ ins Verhältnis gesetzt wurden und (B) MRM-Übergänge von SMX und diejenigen mit inverser Korrelation zu SMX bei vergleichbarem kinetischen Verlauf.

Weshalb die unterschiedlichen Messmodi nicht zur Identifizierung des Stoffes geführt haben, kann viele Gründe haben. Eine Möglichkeit ist, dass es sich um den in Abbildung 36 beschriebenen Fall 3 handelt. Mögliche Konjugationen an beiden Aromaten wurden errechnet und die hypothetischen MRM-Übergänge vermessen. Keiner der Massenübergänge lieferte jedoch ein Signal. Eine andere Möglichkeit ist, dass das SMX-Konjugat bei 6 min deutlich schlechter als SMX ionisiert und daher nicht nachgewiesen werden konnte. Die Ionisierbarkeit von N^4 -Acetyl-SMX war, unter den gewählten Parametern, im Vergleich zu SMX etwa 4,5-fach schlechter. N^4 -Acetyl-SMX, welches in ähnlicher Molarität in der Ablaufprobe 1 vorkam, war jedoch noch mit dem vorgestellten Ansatz gut detektierbar (Abbildung A6). Der unbekannte SMX-Metabolit müsste daher eine sehr viel niedrigere Ionisierbarkeit als SMX aufweisen. Eine weitere Erklärung könnte die Tatsache sein, dass es sich um eine Konjugation mit einem größeren Molekül, wie DNA, Proteinen oder Peptiden handelt. Diese würden, wie der Tracer zeigt, in der Lage sein, an den Antikörper zu binden, wären mit dem verwendeten Triple-Quadrupol-Gerät aber nicht nachweisbar. Quadrupole können typischerweise nur bis zu einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von 2000 Da messen. Da Ionen auch höhere Ladungszustände als eins annehmen können, können auch ionisierte Moleküle gemessen werden, welche eine

Molekülmasse größer 2000 Da aufweisen. Durch die höheren Ladungszustände wird aber die Interpretation der Spektren deutlich komplexer. Für den Fall, dass ein Makromolekül mittels Quadrupol-Analysator gemessen werden kann, sind die erhaltenen Produkt-Ionen nach Fragmentierung bei größeren Molekülen in ihrer Anzahl und Variation des m/z -Verhältnisses deutlich komplexer als für kleine Analyten. Es ist unabhängig vom verwendeten massenspektrometrischen Analysator nicht zu erwarten, dass aus den Fragmentspektren noch die für SMX typischen Fragmente oder Neutralverluste erkannt werden. SMX-Fragmente werden höchstwahrscheinlich je nach Position und Art der Verknüpfung an andere unbekannte Fragmente des Makromoleküls kovalent gebunden sein. Am wahrscheinlichsten ist die Konjugation an der N^4 -Position, welche dann auch zur Konjugation mit den Produkt-Ionen führt. Da das Makromolekül in sehr viele Fragmente zerfällt, treten die SMX-typischen Neutralverluste nicht mehr auf. Fall 2 würde in der vereinfacht dargestellten Form nicht beobachtet werden. Zudem wären die gebildeten Produkt-Ionen auch nicht mehr die SMX-typischen Fragmente mit einem gleichen additiven Makromolekülfragment. Da zur Bildung der SMX-Fragmente für jedes Fragment eine andere Kollisionsenergie verwendet wird, ist es wahrscheinlich, dass sich die an der N^4 -Position konjugierten Makromolekülfragmente unterscheiden werden. Es werden somit auch nicht die Differenzen der m/z -Verhältnisse, die für SMX-Fragmente beobachtet werden, erhalten. Die für größere Molekülionen und Produkt-Ionen typischen Mehrfachladungen verkomplizieren eine Interpretation und Identifikation der Fragmente noch erheblich. Es würden darüberhinaus Ladungsserien auftreten, wodurch die Intensität der einzelnen Signale deutlich geringer ist als bei einfach geladenen Ionen.

In einem Suspected-Target-Screening wurden die Umweltproben mittels LC-MS/MS nach unterschiedlichen potenziellen Kreuzreaktanden, wie existierende Metaboliten des SMX oder nicht als Referenzstandard vorliegende Sulfonamide, hin untersucht. Dabei wurden 192 MRM-Übergänge, welche für 77 Stoffe stehen, gleichzeitig vermessen. Es konnten lediglich die für den Verdacht des Vorliegens einer Substanz notwendigen Bedingungen für einen Stoff detektiert werden. Es handelte sich um das vermutete SMX- N^4 -Glc. Da ein Referenzstandard kommerziell nicht erhältlich war, wurde SMX- N^4 -Glc synthetisiert. Es zeigten sich jedoch andere Signalintensitätsverhältnisse der MRM-Übergänge und eine andere Elutionszeit. Des Weiteren wurde versucht, den bisher unbekannten SMX-Metaboliten mit einer Elutionszeit von etwa 6 min zu identifizieren. Dabei wurden verschiedene Messmodi angewendet, wie die Messung des Quasi-Molekülions der für SMX bekannten Fragmente, die Messung der Ionen, welche die für SMX bekannten Neutralverluste zeigen und die Aufnahme eines Fullscan-Spektrums. Für alle Messmodi wurde der positive und negative Ionisationsmodus verwendet und der m/z -Bereich von 50-800 Da vermessen. Dabei

konnte jedoch kein Stoff detektiert werden, welche für die Interferenz verantwortlich ist. Aufgrund des Ausbleibens eines positiven Befundes lässt sich ableiten, dass der SMX-Metabolit entweder eine deutlich niedrigere Ionisierbarkeit als SMX zeigt, auf beiden Seiten der Sulfonamidbindung konjugiert ist oder SMX mit einem Makromolekül konjugiert ist, welches sich aufgrund der Verwendung des Quadrupol-Analysators oder höheren Ladungszuständen nicht einfach nachweisen ließ. Die genannten Szenarien würden auch erklären, weshalb der Metabolit bisher noch nicht bekannt ist. Eine massenspektrometrische Erkennung von Konjugationen eines kleinen Analyten, wie Sulfamethoxazol, mit einem unbekannten Makromolekül ist aufgrund der komplexen Fragmentierungen und erhaltenen Spektren fast unmöglich. Erst der LC-ELISA, der auf einer strukturellen Erkennung des Analyten beruht, kann einen Beitrag leisten um diese Art von Metaboliten zu erkennen. Diese Metaboliten könnten einen Einfluss auf die Ökologie der Gewässer haben und zur Bildung von Antibiotikaresistenzen beitragen. Dass Konjugate von Makromolekülen und kleinen Analyten wie Pharmazeutika noch die Bindungseigenschaften kleiner Analyten aufweisen können, ist anhand der Analyt-Peroxidase-Konjugate, dem Tracer, bei jedem ELISA nachweisbar. Das Auftreten einer Konjugation von SMX mit Proteinen, bei Kontakt mit normalen menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEKs) und humanen Keratinozyten-Zelllinie (HaCaT) wurde schon gezeigt [103]. Eine kovalente Bindung von SMX an Proteine wurde auch schon von Cribb et al. (1996) beschrieben [104].

2.4 Fließschema zur Validierung von Immunoassays

In diesem Kapitel wird ein Fließschema vorgestellt, wie sich der Anwender der Problematik von Interferenzen bei Immunoassays annähern sollte und versuchen sollte diese einzuordnen. Außerdem sollen Möglichkeiten der Reduktion von Interferenzen diskutiert werden.

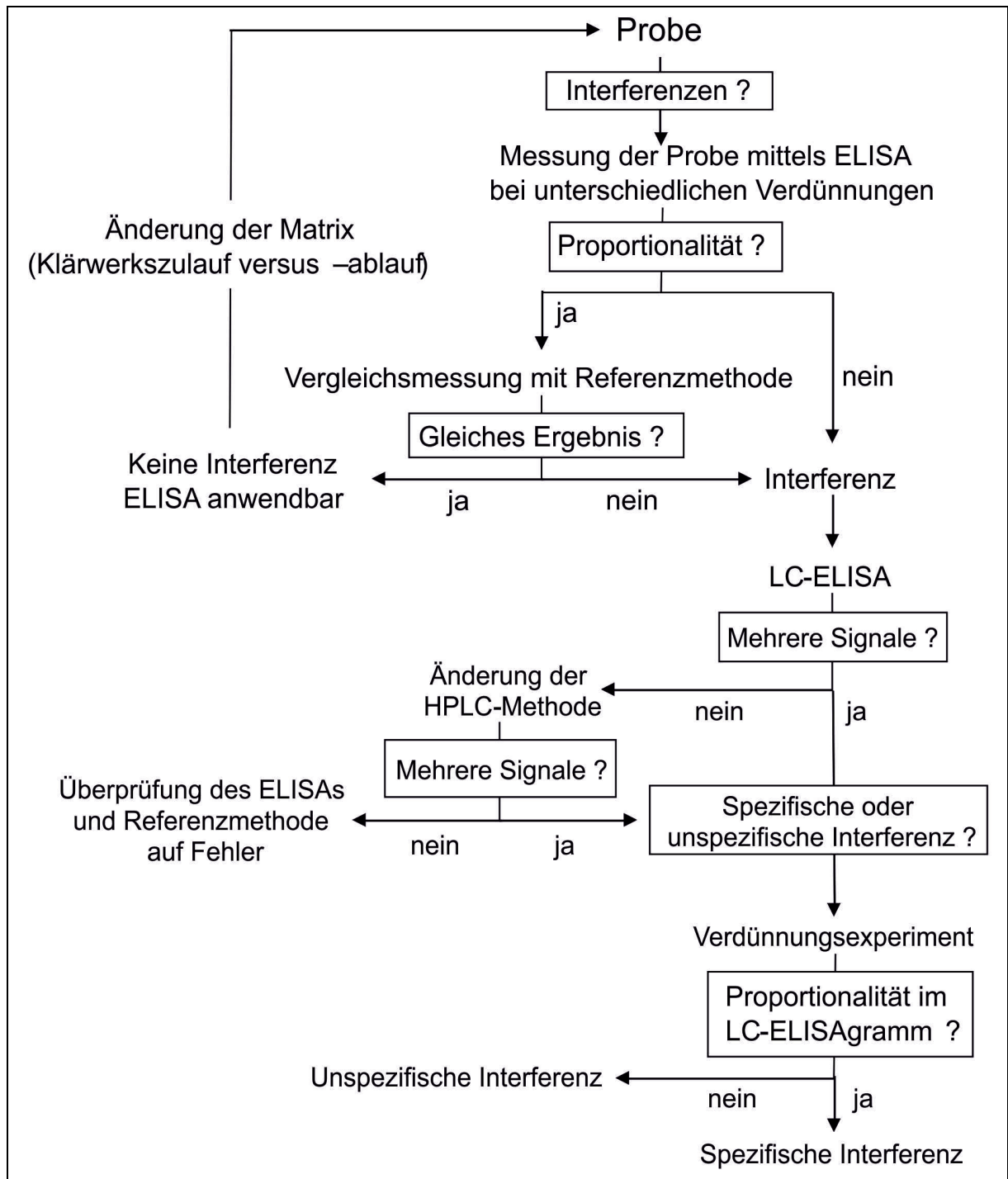


Abbildung 38: Fließschema zur Identifizierung und Einordnung von Interferenzen.

Um das Vorhandensein von Interferenzen zu erkennen und damit die Empfehlung zu erhalten, Zusammenhänge mittels LC-ELISA zu untersuchen, sollte die Probe bei unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren vermessen werden. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, bietet es sich an, 4 verschiedene Anreicherungsfaktoren mit einem Unterschied im Anreicherungsfaktor von mindestens Faktor 8 zu testen. Da die Ergebnisse gezeigt haben, dass sich die Messergebnisse für kleine Anreicherungsfaktoren einer Art Grenzwert annähern, sollten hohe Anreicherungsfaktoren getestet werden. Idealerweise sollte der gesamte quantifizierbare Konzentrationsbereich des ELISAs ausgenutzt werden. Wird für die erhaltenen, auf einen Anreicherungsfaktor normierten, Konzentrationsergebnisse kein signifikanter Konzentrationsunterschied erhalten, spricht dies dafür, dass keine Interferenz vorliegt. Der ermittelte Konzentrationswert sollte mit einer Referenzmethode überprüft werden. Liefern beide einen ähnlichen Wert, kann eine Interferenz ausgeschlossen werden. Das Verfahren sollte jedoch bei Änderung der Probenmatrix wiederholt werden. Wird bei der Referenzmethode eine signifikant unterschiedliche Konzentration gemessen oder die erhaltenen Konzentrationen bei der ELISA-Messung zeigen ein disproportionalen Verhalten, dann liegt mit großer Wahrscheinlichkeit eine Interferenz vor. In einem nächsten Schritt kann der, in dieser Arbeit entwickelte und vorgestellte, LC-ELISA zur Anwendung kommen. Dabei sollte zunächst eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden und die LC-ELISAGramme von Leerproben aufgenommen werden. Wenn dies zu zufriedenstellenden Ergebnissen führt, können ausgewählte Umweltproben mittels LC-ELISA vermessen werden. Sollte dabei nur ein Interferenzsignal detektiert werden, liegt wahrscheinlich eine Co-Elution mehrerer interferierender Stoffe vor. Kann trotz Änderung der HPLC-Methode kein zweites Signal detektiert werden, besteht der Verdacht, dass ein Problem beim ELISA oder der Referenzmethode vorliegt. Wenn mehrere Signale im LC-ELISAGramm vorhanden sind, können Vermessungen der Probe mittels LC-ELISA bei unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren Informationen über deren Art liefern. Bei einem proportionalen Zusammenhang von Anreicherungsfaktor und gemessener Analyt-Äquivalentkonzentration kann vom Analyten oder einem Kreuzreaktanden ausgegangen werden. Bei einem disproportionalen Zusammenhang handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Interferenz. Da dieser Zusammenhang stark konzentrationsabhängig ist und auch Kreuzreaktanden Signale mit einem disproportionalen Zusammenhang aufweisen können, sind die erhaltenen Ergebnisse kritisch und die Schlussfolgerungen lediglich als Orientierung anzusehen.

Um Interferenzen zu eliminieren, können verschiedene Methoden angewendet werden. Eine einfache Methode zur möglichen Reduktion von Interferenzen ist die Hydrolyse von interferierenden Stoffen, da es sich um Konjugate handeln könnte.

Denkbar ist die saure bzw. basische und enzymatische Hydrolyse. Es sollte bei jeder Probenbehandlung stets bedacht werden, dass diese mit dem hohen Probenumsatz des ELISAs, von mehreren hundert Proben in wenigen Stunden, vereinbar sein sollte. Ein anderer Ansatz ist der Wechsel des Probenpuffers. Dabei können beispielsweise pH-Wert oder Salzkonzentrationen verändert werden, auch ein Zusatz von Additiven wie BSA kann zu einer Reduktion von Überbestimmungen führen. In dieser Arbeit konnte dies für die hier vorgestellten ELISAs jedoch nicht beobachtet werden. Eine deutlich aufwendigere aber noch mit dem hohen Probenumsatz vereinbare Möglichkeit ist die Änderung des Tracers. Dadurch kann die Selektivität und Sensitivität eines ELISAs verbessert werden. Die in der Literatur beschriebenen und in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen jedoch, dass eine vollständige Eliminierung von Interferenzen dadurch wohl nicht möglich ist. Es sollte vorher entschieden werden, wie groß der Aufwand für die Synthese eines neuen Tracers sein sollte. Typischerweise können die größten Verbesserungen erhalten werden, wenn die für die Verknüpfung von Analyt und Detektionseinheit verwendete Brücke an einer anderen Position am Analyten gebunden ist als zuvor. Dies führt aber häufig dazu, dass eine völlig andere Synthese des Haptens notwendig wird. Die wohl effektivste aber auch zeit- und kostenaufwendigste Methode um Interferenzen zu beseitigen, ist der Wechsel der für den ELISA verwendeten Antikörper. Die Selektivität des Assays hängt maßgeblich von der Selektivität der Antikörper ab, so dass dort das höchste Verbesserungspotenzial steckt. Beispielsweise könnte die Probe unter Verwendung von zwei verschiedenen für den Analyt selektiven Antikörpern vermessen werden. Diese könnten unterschiedliche Affinitäten zu Matrixeffekten wie Kreuzreaktanden zeigen und es erlauben Interferenzen rechnerisch zu eliminieren. Erwähnt werden soll auch die Anwendung der Probenvorbereitung. Durch Festphasenextraktion oder Flüssig-Flüssig-Extraktionen lassen sich Proben leicht anreichern und gegebenenfalls auch aufreinigen. Eine vollständige Abtrennung von Kreuzreaktanden, wie etwa Analyt-Metaboliten, ist aufgrund derer ähnlicher Struktur und damit ähnlichen physikochemischen Eigenschaften wie Löslichkeit, schwierig. Eine selektivere Abtrennung von Begleitstoffen könnte durch den Einsatz von Immunaффinitätssäulen erhalten werden. Dabei werden Kartuschen verwendet, welche mit Antikörpern beladen sind, die selektiv den Analyten binden. Da bei dieser Immunaффinitätsaufreinigung nicht nur die Bindungsaffinität der Antikörper, sondern auch die Kinetik der Gleichgewichtseinstellung des Adsorption-Desorptions-Gleichgewichts des Analyten an den Antikörper eine Rolle spielt, könnten auch Stoffe mit hoher Kreuzreaktivität abgetrennt werden.

3. Zusammenfassung und Ausblick

Es wurde eine Methode zur Validierung von Immunoassays hinsichtlich Kreuzreaktanden und Matrixeffekten entwickelt und validiert. Dabei wurden Proben mittels HPLC in Fraktionen aufgetrennt und diese Fraktionen mittels ELISA vermessen. Diese Methode wurde als LC-ELISA und das erhaltene Profil, welches die gemessene Konzentration als Funktion der Elutionszeit zeigt, als LC-ELISAGramm bezeichnet. Ob die Anwendung des LC-ELISAs notwendig ist, kann erkannt werden, wenn Proben mit unterschiedlichen Anreicherungs-faktoren mittels ELISA vermessen werden. Wenn die erhaltenen Konzentrationen sich nicht proportional zum Anreicherungs-faktor verändern, liegt wahrscheinlich eine Interferenz vor und der LC-ELISA kann gegebenenfalls nähere Einsichten liefern.

Um eine sichere Quantifizierung mittels ELISA zu gewährleisten wurde der gut quantifizierbare Konzentrationsbereich hier unter Anwendung eines Präzisionsprofils ermittelt. Für eine Anpassung der Datenpunkte lag bisher jedoch keine Funktion vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine geeignete Funktion entwickelt und erfolgreich angewendet.

Die Proben wurden typischerweise in 70 Fraktionen aufgetrennt, wobei ein gleich langes Zeitintervall für die einzelnen Fraktionen verwendet wurde. Zudem wurden auf die für das Auffangen der Fraktionen verwendeten Mikrotiterplatten Kalibrierstandards aufgetragen, welche als eine Art interner Standard dienten. Durch diese Standards konnten eine gute Quantifizierung der Konzentrationen in den Fraktionen und eine Überwachung über mögliche Verluste oder Kontamination während des Verfahrens erfolgen. Die Wiederholpräzision des LC-ELISAs war mit Standardabweichungen für Doppelbestimmungen von um 25 % akzeptabel, so dass die Proben aus Zeit- und Kostengründen nur als Doppelbestimmung vermessen wurden.

Es stellte sich die Frage der zweckmäßigen zeitlichen Auflösung des LC-ELISAs. Zur Klärung wurden unterschiedlich lange Fraktionierungsintervalle getestet, wobei das kürzeste eine Dauer von 3 s hatte. Dies entsprach bei den gewählten HPLC-Methoden 1-2 Tropfen Eluat pro Fraktion. Es zeigte sich, dass eine zeitliche Auflösung von weniger als 9 s nicht zu einem zusätzlichen Informationsgewinn führte, jedoch der Kosten- und Zeitaufwand anstieg. Ein Fraktionierungsintervall von 3 s und weniger kann aber bei schmalen Signalen, wie sie zum Beispiel bei der Ultra-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie erhalten werden, zwingend notwendig werden, um das Signal noch sicher aufzulösen. Die Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission schlägt für LC-Immunogramme vor, dass jede Fraktion kleiner als die Hälfte der Peakbreite sein müsse. Dieses und andere in der Richtlinie

genannte Kriterium wurden für die in dieser Arbeit vorgestellten LC-ELISAGramme eingehalten.

Anhand der Vermessung dotierter Leerproben und durch Vergleich der mittels LC-MS/MS und LC-ELISA erhaltenen Konzentrationsergebnisse natürlich belasteter Umweltproben konnte eine gute Wiederfindung der erwarteten Konzentrationen mittels LC-ELISA erhalten werden. Auf Grundlage der guten Quantifizierungseigenschaften die der entwickelte LC-ELISA zeigte, wurde versucht, zwischen unspezifischen und spezifischen Interferenzen zu unterscheiden. Die Probe wurde dabei bei unterschiedlichen Anreicherungsfaktoren mittels LC-ELISA vermessen. Signale, welche keinen proportionalen Zusammenhang von Äquivalentkonzentration und Anreicherungsfaktor zeigten, wurden unspezifischen Interferenzen zugeordnet. Es wurde jedoch gezeigt, dass auch Kreuzreaktanden diesen disproportionalen Zusammenhang aufweisen können.

Der Einfluss der SPE-Anreicherung wurde ebenfalls evaluiert, wobei sich zeigte, dass dies bei Anwendung deutlich verschiedener Sorbensmaterialien zu deutlich verschiedenen LC-ELISAGrammen führen kann.

Eine Änderung des verwendeten Probenpuffers, wie Wechsel des pH-Wertes oder Zusatz von Rinderserumalbumin kann zur Reduktion von Interferenzen führen, was jedoch in dieser Arbeit für SMX-LC-ELISAGramme nicht beobachtet werden konnte. Effektiver war die saure Hydrolyse der Probe mit HCl. Dadurch konnte ein potenter Kreuzreaktand mit einer Kreuzreaktivität von etwa 600 %, das *N*⁴-Acetyl-SMX, zum Zielanalyten SMX hydrolysiert werden. Neben dem Abbau von *N*⁴-Acetyl-SMX, konnte noch die Reduktion eines Signals bei einer Elutionszeit von ca. 6 min im SMX-LC-ELISAGramm von Klärwerksablaufproben beobachtet werden. Bei Sammlung einer Fraktion im Elutionszeitfenster 5,8-6,1 min und einer anschließenden sauren Hydrolyse konnte die Bildung von SMX gemessen werden. Aus der erhaltenen Signalintensität im LC-ELISAGramm und der gebildeten Menge an SMX, konnte die Kreuzreaktivität des unbekannten Stoffes mit 460 % abgeschätzt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, jedoch aufgrund der fehlenden Referenzsubstanz nicht sicher, ob der SMX-Metabolit für das Interferenzsignal im LC-ELISAGramm verantwortlich ist. In einem Suspected-Target-Screening wurde versucht, die fragliche Substanz zu identifizieren, was jedoch nicht gelang. Auf Basis des Ausbleibens eines positiven Detektionsnachweises, liegt der Verdacht nahe, dass dieser SMX-Metabolit entweder deutlich schlechter als SMX bei Verwendung von ESI ionisiert, auf beiden Substituenten am Sulfonamid-Kern metabolisiert ist oder eine Konjugation mit Makromolekülen, wie Proteinen oder Peptiden vorliegt. Dass makromolekulare Konjugate in der Lage sind, an den Antikörper zu binden, ist am verwendeten SMX-Peroxidase-Konjugat, dem Tracer, zu erkennen. Eine Möglichkeit,

um mehr Informationen über das Konjugat zu erhalten, wäre eine Separation der Fraktion von 5,8-6,1 min mittels Größenausschlusschromatographie. Durch Anwendung verschiedener Säulen und unter Zuhilfenahme von Referenzstandards könnte das hydrodynamische Volumen des SMX-Metaboliten abgeschätzt werden.

Im Rahmen der Arbeit wurde die Synthese eines neuen Tracers entwickelt und durchgeführt, eine lineare 10-Stufen-Synthese mit einer Gesamtausbeute von 26 %. Mit dem erhaltenen Hapten wurden in einer anschließenden linearen 3-Stufen-Synthese der Tracer beziehungsweise ein Immunogen synthetisiert. Bei dem neuartigen Hapten erfolgt die Verknüpfung von Hapten und Peroxidase über eine Brücke, welche an der N^1 -Position von SMX kovalent gebunden ist. Dieser Typ ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. In der Vergangenheit erfolgte die Verknüpfung über die N^4 -Position von SMX, was aber zu den auch in dieser Arbeit erhaltenen hohen Kreuzreaktivitäten von N^4 -Metaboliten führen kann. Der zweite Typ umfasste eine Substitution des SMX-spezifischen 5-Methylisoxazolrings, was in hohen Kreuzreaktivitäten mit anderen Sulfonamiden resultieren kann. Durch Anwendung des neuen Immunogens könnten bei einer zukünftigen Immunisierung Antikörper mit bisher nicht erreichter Selektivität erhalten werden. Durch Einsatz des neuen Tracers konnten die Kreuzreaktivitäten verschiedenster N^4 -Metaboliten des SMX und anderer Sulfonamide um etwa den Faktor 2-3 gesenkt werden. Die Sensitivität des ELISAs hinsichtlich SMX konnte um etwa den Faktor 12 gesteigert werden.

Um auftretende Interferenzen zu erklären, wurde versucht, mittels Target-Screening schon bekannte Kreuzreaktanden in den Umweltproben nachzuweisen. Neben N^4 -Acetyl-SMX konnten 8 weitere Stoffe nachgewiesen werden, wobei diese sehr niedrige Kreuzreaktivitäten aufwiesen.

Durch elektrochemische Behandlung von Sulfamethoxazol und Estron wurde versucht, neue Kreuzreaktanden zu synthetisieren. Es konnten jedoch keine umweltrelevanten Kreuzreaktanden, in Bezug auf bisher untersuchte Umweltmatrices, dargestellt werden.

Der LC-ELISA bietet das Potenzial Konjugate von vergleichsweise kleinen Analyten, wie die in dieser Arbeit untersuchten, und Makromolekülen zu identifizieren. Der ELISA basiert auf einer strukturellen Erkennung des kleinen Analyten und kann daher orthogonal zu anderen Methoden wie der Massenspektrometrie eingesetzt werden. Massenspektrometrisch ist es nahezu unmöglich, das Konjugat eines kleinen Analyten mit einem unbekannten Makromolekül zu identifizieren, wenn keine detaillierten Informationen über die miteinander reagierenden Stoffe vorliegen.

Der LC-ELISA wurde, auch wenn in dieser Arbeit die Ergebnisse nicht vorgestellt wurden, für die Detektion von Interferenzen in Diclofenac- und Isolithocholsäure-

ELISAs angewendet. Zukünftig soll der LC-ELISA auch für weitere Immunoassays getestet werden. Zudem wäre eine andere Form des parallelen Vermessens von LC-ELISA und LC-MS/MS wünschenswert. Bisher wurden zwei separate Systeme mit dem gleichen Säulentyp verwendet. Eine Kombination in einem Gerät, welches über ein Schaltventil, zum einen das Eluat zum Massenspektrometer und bei anderer Schaltung zum Fraktionssammler führt, wäre anzustreben. Dies würde eine deutlich genauere Zuordnung von Interferenzsignalen im zeitlich hochaufgelösten LC-ELISAGramm zu Signalen im Massenspektrum ermöglichen.

Eine Verbesserung wäre auch für den zeitlimitierenden Schritt des LC-ELISAs, das Abdampfen des Lösungsmittels, sinnvoll. Das gleichzeitige Entfernen des Lösungsmittels von mehreren Fraktionierungsplatten im Vakuumtrockenschrank wäre denkbar.

Der Einsatz einer anderen Separationsmethode als der HPLC sollte zukünftig auch in Betracht gezogen werden. Dabei bietet sich die Dünnschichtchromatographie (DC) an. Bei der DC liegt eine geringere thermische Belastung während der Separation vor und das Lösungsmittel ist ebenfalls leichter zu entfernen. Eine Kopplung von DC und Immunoassay wurde schon mehrmals berichtet [105-107]. Nach der Separation könnte die für die DC verwendete Platte leicht in Abschnitte zerschnitten und durch Ablösen der adsorbierten Stoffe Fraktionen erhalten werden. Diese Fraktionen könnten in eine Mikrotiterplatte überführt und wie die Fraktionen des LC-ELISAs verwendet werden. Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, sollten Standards idealerweise auch auf die DC-Platte aufgetragen werden. Die Anwendung der DC bietet auch den Vorteil der leichteren zweidimensionalen Trennung. Durch ein einfaches Drehen der Platte um 90° nach der ersten Trenndimension, könnten alle Fraktionen parallel und einfach in einer zweiten Dimension getrennt werden. Ob eine ausreichend gute Selektivität und Trennleistung erhalten wird, selbst unter Verwendung der hochauflösenden DC, muss im Einzelfall getestet werden.

Für eine zukünftige Vermessung von Proben mit den Antikörpern, welche durch Immunisierung mit dem in dieser Arbeit synthetisierten neuen Immunogen erhalten wurden, sollte ein pH-Wert von 4,5 gewählt werden. SMX besitzt einen pKs-Wert von 5,6 durch ein acides Proton an der N¹-Position. Bei Vermessung von SMX kann diese Amino-Funktion im neutralen Milieu deprotoniert werden und eine negative Ladung vorliegen. Das neue Hapten weist an der N¹-Position ein dreifach substituiertes Stickstoffatom auf, welches nicht deprotoniert werden kann. Hapten und Analyt würden sich daher im neutralen Milieu in ihrem Ladungszustand unterscheiden. Bei einem pH-Wert von 4,5 liegen über 90 % der SMX-Moleküle protoniert vor. Ein unterschiedlicher Ladungszustand zwischen SMX und Hapten kann dadurch vermieden werden. Dieser pH-Wert ist aber für die verwendete

Peroxidase nicht optimal. Versuche zur Inaktivierung der Peroxidase haben jedoch gezeigt, dass man nach 30-minütiger Inkubation in einer Citrat-Pufferlösung mit pH = 4,5 im Mittel noch über 90 % der Aktivität messen kann, welche bei Inkubation bei pH = 7,6 erhalten wird. Das neue SMX-Hapten ist an der *N*⁴-Position nicht substituiert. Trotzdem kann für die neuen Antikörper eine auftretende Interferenz mit *N*⁴-Acetyl-SMX nicht ausgeschlossen werden. Im Prinzip verfügen alle Arten, von Bakterien bis hin zum Menschen, über eine Arylamin-*N*-Acetyltransferase die SMX acetylieren könnte [108]. Es ist jedoch unwahrscheinlich, besonders im Hinblick auf die sterische Hinderung durch das Rinderserumalbumin, dass alle Hapten-Moleküle acetyliert werden. Je nach Spezies schwankt der Anteil an SMX der acetyliert wird. Daher kann durchaus damit gerechnet werden, dass Antikörper gegen SMX mit freiem Amin an der *N*⁴-Position gebildet werden. Besonders bei Immunisierung einer Maus kann für SMX, analog zu Sulfamethazin, mit einem sehr niedrigen Acetylierungsgrad gerechnet werden [109].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es durch Anwendung des LC-ELISAs möglich ist natürlich vorkommende Metaboliten in komplexen Umweltproben zu detektieren, welche mit den bisherigen Analysemethoden höchstwahrscheinlich unentdeckt bleiben würden. Das Problem der gegenseitigen Kreuzreaktivität der strukturell ähnlichen Sulfonamide könnte durch die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Haptensynthese gemindert werden. Diese beiden Potenziale sollten nicht ungenutzt bleiben. Es wird eine Aufgabe für die Zukunft sein, sie intensiv anzuwenden und weiterzuentwickeln.

4. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die verwendeten Chemikalien, Geräte, genauen Abläufe der LC-ELISA-Messungen, Synthesen sowie die Parameter der HPLC-Methoden und MS-Messungen aufgeführt. Die für diese Arbeit verwendeten Umweltproben und deren Anreicherung soll ebenfalls vorgestellt werden.

4.1 Geräte und Chemikalien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ammoniumacetat (Fisher chemicals, Analytical reagent grade, 99,3 %), Essigsäure (AcOH, Fisher chemicals, Analytical reagent grade, 99,83 %), Methanol (MeOH, J.T.Baker, HPLC gradient grade), Acetonitril (ACN, J.T.Baker, HPLC gradient grade), Ethanol (EtOH, AppliChem, 99 %), Dimethylsulfoxid (DMSO, J.T.Baker, > 99 %), Schwefelsäure (H₂SO₄, J.T.Baker, 95-97 %), Natriumhydroxid (NaOH, J.T.Baker, > 97 %), Salzsäure (HCl, Merck, extra pure 32 %), Triethylamin (TEA, Fluka, ≥ 99,5 %), Pyridin (Acros, 99+ %), 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP, Fluka, 99 %), Natriumhydrogencarbonat (Fluka, > 98 %), Huminsäure (IHSS Suwannee River 1R101N [110]) und natürliches organisches Material (etwa 30 % Huminsäureanteil [111]) verwendet. Lithiumaluminiumhydrid (LiAlH₄, Pulver, 95 %), Rinderserumalbumin (BSA, Hitzeschock-Fraktion, pH 7, ≥ 98 %), 3-Amino-5-methylisoxazol (98+ %), Methyladipoylchlorid (97 %), *N*-Acetylsulfanilylchlorid (98 %), Tetrahydrofuran (THF, trocken, ≥ 99,9 %), 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (Fmoc-Cl, 97 %), Kaliumpermanganat (KMnO₄, > 99 %), Diammoniumhydrogencitrat (> 98 %), Tetrahydrofuran-d₈ (≥ 99,5 atom %), 2',6'-Dihydroxyacetophenon (DHAP, ≥ 99,5 %), Trifluoressigsäure (TFA, 99 %), *N*-Hydroxysuccinimid (NHS, 98 %), *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 99 %), Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (> 99 %), Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat (> 99 %), Natriumchlorid (> 99,5 %), Natriumdihydrogencitrat (> 99 %), Kaliumsorbat (> 99 %), Dikaliumhydrogenphosphat (> 99 %), Kaliumdihydrogenphosphat (> 99 %) Tetrabutylammoniumborhydrid (TBABH, > 98 %), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA, > 99,8 %), *N,N*-Dimethylformamid (DMF, > 99,8 %), Wasserstoffperoxid (TraceSELECT® grade ≥ 30 %), Acetobromo-α-D-glucuronsäuremethylester (≥ 93 %), Molsieb (3Å, Pulver), Silbercarbonat (99 %) und Glycin (≥ 99 %) wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Es wurde darüber hinaus eine Reinstwasseranlage (Milli-Q Synthesis A10, Merck Millipore, Schwalbach, Germany), 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und Tween® 20 von Serva, 4-Methylmorpholin (Fluka, 98 %), Meerrettichperoxidase (POD, Roche, Mannheim, > 90 % isoenzyme C), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

(Tris, Merck, > 99,8 %) und Dinatriummethyldiamintetraacetat (ACS Reagent, ≥ 99 %) verwendet. Als flachbödige Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten wurden unbehandelte (Nunc, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), glasbeschichtete (Microplate Plate+ Glass coated 96 well plate, 370 µL, labhut), hochbindende (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany), nicht-bindende (Greiner Bio-One) und UV-Star-Platten (Greiner Bio-One) benutzt. Zur Aufreinigung der Proben wurden Faltenfilter (Sartorius stedim, Göttingen, Germany, qual., grade 1288) und zur Anreicherung folgende SPE-Kartuschen unter Benutzung der semi-automatischen SPE-Station Autotrace Tekmar-SPE (Dionex) verwendet: Strata-X (33 µm Polymeric Reversed Phase, Phenomenex, 500 mg, 6 mL), RP-C18 (J.T.Baker, 500 mg, 6 mL), StrataX-C (Phenomenex, 500 mg, 6 mL), StrataSCX (Phenomenex, 500 mg, 6 mL), AccuBOND (ODS-C18, Agilent Technologies, 500 mg, 6 mL), Supelclean ENVI-18 (Sigma-Aldrich, 1000 mg, 6 mL), Chromabond ABC (Macherey-Nagel, 500 mg, 6 mL), Oasis HLB (Waters, 500 mg, 6 mL), Supelco Dual Layer Envi-CarbII/PSA (Sigma-Aldrich, 500 mg, 6 mL) und ISOLUTE (ODS-C18, Biotage, 500 mg, 6 mL). Zur Aufreinigung von Peroxidase und BSA-Konjugaten wurden PD-10 Säulen (Healthcare Bio-Sciences, Freiburg) verwendet. Zur Identifizierung von Kreuzreaktanden und der Ermittlung derer Kreuzreaktivitäten wurden folgende Standards erworben: 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on (E1, Vetrinal, Sigma-Aldrich, 99,3 %), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol (E2, Vetrinal, Riedel-de Haën, 99,8 %), 1,3,5(10)-Estratrien-3,16α,17β-triol (E3, Vetrinal, Sigma-Aldrich, ≥ 99,9 %), 17α-Ethinyl-1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol (EE2, Vetrinal, Sigma-Aldrich, 99,3 %), 17β-Hydroxy-18-methyl-19-nor-17α-pregn-4-en-20-in-3-on (Levonorgestrel, European Pharmacopeia Reference Standard CRS), 17β-Hydroxy-5α-androstan-3-on (5α-Androstan-17β-ol-3-on, Sigma-Aldrich, ≥ 97,5 %), 4-Androsten-3,17-dion (Androstendion, Sigma-Aldrich, ≥ 98 %), 3α-Hydroxy-5α-androstan-17-on (Androsteron, Sigma-Aldrich, ≥ 99 %), 17β-Hydroxy-3-oxo-4-androsten (Testosteron, Sigma-Aldrich, ≥ 99 %), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-16-on (E2-16-on, Fountain Limited), 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on-2,4,16,16-d4 (E1-d4, Sigma-Aldrich, 95 %), 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on-3-Sulfat (Fountain Limited), 1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-on-3-Glucuronid (Fountain Limited), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-3-Sulfat (Steraloids), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-17-Sulfat (Steraloids), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-3-Glucuronid (Steraloids), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-17-Glucuronid (Steraloids), 1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-3-Glucuronid (Sigma-Aldrich), 17α-Ethinyl-1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-3-Sulfat (Steraloids), 17α-Ethinyl-1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-3-Glucuronid (Steraloids), 17α-Ethinyl-1,3,5(10)-Estratrien-3,17β-diol-17-Glucuronid (Steraloids), 1,3,5(10)-Estratrien-2,3-diol-17-on (2-Hydroxyestron, Santa Cruz Biotechnology, ≥ 80 %). Sulfamethoxazol (SMX, Sigma-Aldrich) SMX-d4 (Campro Scientific, Berlin, Germany), Sulfamethizol, Sulfathiazol, Sulfapyridin, Sulfamethoxypyridazin, Sulfachlorpyridazin,

Sulfamethoxydiazin, Sulfamethazin, Sulfadiazin, Sulfamerazin wurden von Fluka (VETERINAL analytical standard) bezogen, Sulfasalazin (Fluka, > 98 %), 3-Amino-5-methylisoxazol (Sigma Aldrich, > 98 %) *N*⁴-Acetyl-SMX, 4-Nitro-SMX, 4-Nitroso-SMX, SMX- β -D-glucuronid (Toronto Research Chemicals, Toronto, Canada) und Succ-SMX ([19]).

Für die ELISA-Messungen wurden die Mikrotiterplatten mit einem automatischen Plattenwasher (BioTek ELx405 Select™, Bad Friedrichshall, Germany) gewaschen und mit einem Mikrotiterplattenschüttler (Titramax 100, Heidolph, Schwabach, Germany) geschüttelt. Für den ersten Inkubationsschritt wurden anti-Kaninchen Antikörper (Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany R1364P, LOT 27160, 2 mg/mL) bzw. anti-Maus Antikörper (Acris Antibodies GmbH, Herford, Germany R1256P, LOT 21481, 2,7 mg/mL) verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden für längere Inkubationszeiten mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) abgedeckt. Die Extinktionen in den Kavitäten wurden mit einem Mikrotiterplatten-Spektrometer (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, Ismaning, Germany) gemessen. Zum Abdampfen des Lösungsmittels der gesammelten Fraktionen, nach der Separation mittels HPLC, wurde die Abdampfstation (MiniVap, Porvair Sciences, Dunn Labortechnik) verwendet. Für die Vermessung von Proben mittels HPLC wurden HPLC-Vials mit und ohne Einsatz (neoLab Migge, 1,8 mL) benutzt. Für die Synthesen wurden Mikroreaktionsgefäße (Eppendorf, 2 mL) und die Zentrifuge 5417R (Eppendorf) verwendet. Die Einwaagen erfolgten an einer Analysenwaage (R180D-*D1, Sartorius), Präzisionswaage (LP1200S-OCE, Sartorius) und Ultramikrowaage (XP2U/M, Mettler Toledo).

Für die MALDI-Messungen, welche im positiven Ionisationsmodus durchgeführt wurden, wurden 2 μ L Probe mit 2 μ L Matrix (Mischung aus 3 Volumenanteilen 20 g/L DHAP in EtOH und 1 Volumenanteil 18 g/L Diammoniumhydrogencitrat in Reinstwasser) und mit 2 μ L 2 % TFA vermischt, getrocknet und an einem Bruker Autoflex III MALDI-TOF-Instrument vermessen.

NMR-Spektren wurden an einem DMX400 (Bruker BioSpin GmbH) aufgenommen.

4.2 Pufferlösungen

Für die ELISA-Messungen und LC-ELISA-Messungen wurden verschiedene Pufferlösungen verwendet, welche nachfolgend aufgeführt sind.

Tris-Pufferlösung: 1,211 g/L Tris; 8,766 g/L NaCl; pH = 8,5

PBS-Pufferlösung: 1,560 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 12,459 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 8,474 g/L NaCl; pH = 7,6

Substratlösung: 22 mL Citratpuffer (47,104 g/L $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$; pH = 4,0) kurz vor dem Gebrauch Zugabe von 550 μL TMB-Lösung (2,06 g/L TBABH ($\text{C}_{16}\text{H}_{40}\text{BN}$); 9,61 g/L TMB ($\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$) in DMA gelöst) und 8,5 μL H_2O_2

Waschpufferlösung (60-fach konzentriert): 6,124 g/L $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 65,315 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 0,225 g/L $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_2$; 30 mL/L Tween 20; pH = 7,6

Probenpuffer (4,5): 53,55 g/L $\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_7$; 43,85 g/L NaCl; 10 g/L NaOH; pH = 4,5

Probenpuffer (7,6): 15,13 g/L Tris; 10,95 g/L NaCl; 4,98 g/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; pH = 7,6

Probenpuffer (9,5): 18,78 g/L Glycin; 43,83 g/L NaCl; 4,98 g/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$; 5,3 g/L NaOH; pH = 9,5

Die pH-Werte wurden mit einem pH-Meter (Mettler Toledo, SevenEasy S20) vermessen und unter Verwendung von 20 %iger HCl-Lösung bzw. 20 %iger NaOH-Lösung eingestellt.

4.3 Probenahme der Umweltproben

Die Herkunft und Zuordnung der verschiedenen Umweltproben ist nachfolgend beschrieben. Die Klärwerksproben der Berliner Klärwerke wurden als 24-Stunden-Mischproben in Braunglasflaschen vom 14.-16.01.2015 gesammelt und anschließend bei 4 °C gelagert. Dabei gilt folgende Zuordnung zwischen Klärwerk und den in den Ergebnissen aufgeführten Bezeichnungen: Klärwerk 1 – Waßmannsdorf, 2 – Stahnsdorf, 3 – Münchehofe, 4 – Wansdorf, 5 – Ruhleben und 6 – Schönerlinde. Die Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule in Neu-Ulm wurden am 08.12.2015, ebenfalls als 24-Stunden-Mischproben, in Braunglasflaschen abgefüllt. Für die Messung der Abwasserproben des Klärwerks Steinhäule mittels CBZ-LC-

ELISA wurden die Proben am 02.02.2017 in 40 mL Braunglasflaschen gesammelt. Die gesammelten Proben von den Berliner Klärwerken wurden vom Klärwerk Ruhleben abgeholt. Die Proben vom Klärwerk Steinhäule wurden per Post verschickt und erreichten die BAM 3-4 Tage später. Am Tag der Ankunft wurden die Proben mittels Faltenfilter filtriert und angereichert. Lediglich die Proben vom Februar 2017 wurden nicht angereichert und zur Abtrennung von Schwebstoffen 5 min bei 9660 g zentrifugiert. Die Oberflächenwasserproben wurden von Berliner Gewässern wie dem Teltowkanal und Landwehrkanal entnommen. Das Beprobungsdatum und die Koordinaten der Beprobungsorte sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Zuordnung von Oberflächenwasserproben mit Beprobungsort und -datum

Oberflächenwasserbezeichnung	Dezimalkoordinaten	Datum
1 (Teltowkanal)	N 52,433285 O 13,497663	14.07.2014
2 (Teltowkanal)	N 52,4594 O 13,447433	14.07.2014
3 (Teltowkanal)	N 52,434483 O 13,316583	14.07.2014
4 (Teltowkanal)	N 52,4012 O 13,239433	14.07.2014
5 (Teltowkanal)	N 52,399633 O 13,179533	14.07.2014
6 (Landwehrkanal)	N 52,497883 O 13,388683	14.07.2014
7 (Teltowkanal)	N 52,425054 O 13,544943	08.12.2014
8 (Teltowkanal)	N 52,426065 O 13,526738	08.12.2014
9 (Teltowkanal)	N 52,433285 O 13,497663	08.12.2014
10 (Havel)	N 53,367679 O 12,889659	08.12.2014
11 (Havel)	N 53,365547 O 12,892379	08.12.2014
12 (Havel)	N 53,364912 O 12,893116	08.12.2014

4.4 Festphasenextraktion

Die Proben wurden halbautomatisch mittels einer AutoTrace Tekmar-SPE Arbeitsstation (Dionex) angereichert. Dazu wurden die unter Kapitel 4.1 aufgeführten SPE-Kartuschen verwendet. Der Ablauf der Anreicherung war stets der gleiche. Zunächst wurde die Kartusche mit 10 mL MeOH gewaschen und anschließend mit 10 mL Reinstwasser äquilibriert. Es folgte die Auftragung der Probe (100 mL, 500 mL bzw. 1000 mL). Danach wurden die Kartuschen 15 min im Stickstoffstrom (20 psi) getrocknet. Zur Elution von adsorbierten Stoffen wurden 10 mL MeOH verwendet. Die Flussrate an Lösungsmittel betrug stets 10 mL/min. Das aufgefangene Eluat wurde anschließend im Stickstoff- oder Druckluftstrom bis zur Trockne eingeeengt und in einem definierten Volumen einer Mischung aus 70/30 (v/v) Reinstwasser/MeOH gelöst. Für Klärwerksabläufe wurde eine 500-fache Anreicherung (500 mL zu 1 mL) gewählt. Klärwerkszuläufe wurden 100-fach (100 mL zu 1 mL) und Oberflächenwasserproben 500-fach bzw. 1000-fach (1 L zu 2 mL bzw. 1L zu 1 mL) angereichert.

Zur Bestimmung der Wiederfindungen von SMX und E1 wurde 1 L Reinstwasser mit 978 ng SMX bzw. 100 ng E1 dotiert und 1000-fach angereichert. Nach der Elution wurden die Extrakte mit 1000 ng SMX-d4 bzw. 100 ng E1-d4 versetzt, eingeeengt, gelöst und mittels LC-MS/MS vermessen. Für die Wiederfindung von SMX und E1 in den Umweltproben, wurden die Proben vor der SPE und nach der SPE mit 100 ng SMX-d4 bzw. 20 ng E1-d4 dotiert. Anschließend wurden die erhaltenen Analytkonzentrationen bei Dotierung nach der SPE zu vor der SPE ins Verhältnis gesetzt.

4.5 Durchführung des ELISAs

In diesem Abschnitt soll der Ablauf der jeweiligen ELISAs vorgestellt werden, welcher so auch für den jeweiligen LC-ELISA verwendet wurde.

4.5.1 ELISA zur Bestimmung von Sulfamethoxazol

In die 96 Kavitäten einer hochbindenden Mikrotiterplatte wurden kommerziell erhältliche anti-Kaninchen Antikörper (R1364P), 1:1000 verdünnt in PBS-Pufferlösung, mit 200 µL/Kavität hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedeckt und 18 h bei Raumtemperatur mit 750 Umdrehungen/min geschüttelt. Diese Schüttelintensität und Raumtemperatur wurde für alle in dieser Arbeit aufgeführten Inkubationsschritte verwendet. Anschließend wurde die Platte unter Verwendung des einfachen Waschpuffers mittels Plattenwasher gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die polyklonalen anti-SMX Antikörper [19] bei Verwendung einer 1:100 000 Verdünnung in PBS-Puffer mit 200 µL/Kavität auf die Platte aufgetragen und die Platte für 30 min geschüttelt. Die Platte wurde wieder mittels Plattenwasher gewaschen und anschließend die Proben bzw. Kalibrierstandards mit 100 µL/Kavität aufgetragen. Nachdem die Platte 15 min geschüttelt wurde, wurde der SMX-Tracer 100 000-fach verdünnt in Tris-Pufferlösung mit 100 µL/Kavität in alle Kavitäten hinzugegeben und die Platte für weitere 30 min geschüttelt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Aufgabe von 200 µL/Kavität Substratlösung. Nach 30 min wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 1 M H₂SO₄ (100 µL/Kavität) gestoppt. Die Extinktionen bei 450 nm und 620 nm wurden pro Kavität mittels Mikrotiterplatten-Spektrometer vermessen und die Differenz der Extinktionen (Messwert bei 450 nm minus Messwert bei 620 nm) ermittelt. Zur Auswertung wurde die Software SoftMax Pro (Version 5.3, Molecular Devices) verwendet.

4.5.2 ELISA zur Bestimmung von Estron

In die Kavitäten einer hochbindenden Mikrotiterplatte wurden kommerziell erhältliche anti-Maus Antikörper (R1256P), 1:1000 verdünnt in PBS-Pufferlösung, mit 200 µL/Kavität hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedeckt und 18 h geschüttelt. Anschließend wurde die Platte unter Verwendung des einfachen Waschpuffers mittels Plattenwasher gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die monoklonalen anti-E1 Antikörper (E1-HC7) [112] bei Verwendung einer 1:300 000 Verdünnung in PBS-Puffer mit 200 µL/Kavität auf die Platte aufgetragen und die Platte für 60 min geschüttelt. Die Platte wurde wieder mittels Plattenwasher gewaschen und anschließend die Proben bzw. Kalibrierstandards mit 100 µL/Kavität aufgetragen. Nachdem die Platte für 15 min geschüttelt wurde, wurde der E1-Tracer 600 000-fach verdünnt in Tris-Pufferlösung mit 100 µL/Kavität in alle Kavitäten hinzugegeben und die Platte für weitere 30 min geschüttelt. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Aufgabe der Substratlösung, das Abstoppen der Farbentwicklung und Vermessung der Extinktionsdifferenz analog zum SMX-ELISA (Kapitel 4.5.1).

4.5.3 ELISA zur Bestimmung von Carbamazepin

In die Kavitäten einer hochbindenden Mikrotiterplatte wurden kommerziell erhältliche anti-Maus Antikörper (R1256P), 1:2000 verdünnt in PBS-Pufferlösung, mit 200 µL/Kavität hinzugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit Parafilm abgedeckt und 18 h geschüttelt. Anschließend wurde die Platte unter Verwendung des einfachen Waschpuffers mittels Plattenwasher gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die bereits 1:100 vorverdünnten monoklonalen anti-CBZ Antikörper (AK 2512/01) [113] noch 1:200 000 in PBS-Puffer verdünnt und mit 200 µL/Kavität auf die Platte aufgetragen. Die Platte wurde für 60 min geschüttelt. Anschließend wurde die Platte mittels Plattenwasher gewaschen und die Proben bzw. Kalibrierstandards mit 150 µL/Kavität aufgetragen. Nachdem die Platte 15 min geschüttelt wurde, wurde der schon 1:1000 verdünnte CBZ-Tracer nochmals 1:1000 in 4-fach konzentrierten Probenpuffer (9,5) verdünnt mit 50 µL/Kavität auf die Platte aufgetragen. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit erfolgte das Waschen der Platte sowie die Aufgabe der Substratlösung, das Abstoppen der Farbentwicklung und Vermessung der Extinktionsdifferenz analog zum SMX-ELISA (Kapitel 4.5.1).

4.6 LC-Methoden

Für die Messung mittels LC-ELISA und LC-MS/MS wurden unterschiedliche HPLC-Methoden verwendet, welche nachfolgend aufgeführt sind.

Tabelle 11: *Bedingungen der HPLC-Methode 1*

Zeit in min	Reinstwasser + 0,1 % AcOH + 10 mM NH ₄ Ac in %	MeOH + 0,1 % AcOH + 10 mM NH ₄ Ac in %
0	80	20
3	80	20
8	5	95
12	5	95
14	80	20
22	80	20

Dabei wurden eine Säulenofentemperatur von 50 °C und eine Flussrate von 350 µL/min gewählt. Für die HPLC-Methode 1 wurde die Kinetex XB-C18 (2,6 µm, 150 mm x 3 mm, 100 Å) mit einer UHPLC C18, 3 mm-Vorsäule (beide Phenomenex) verwendet.

Tabelle 12: *Bedingungen der HPLC-Methode 2*

Zeit in min	Reinstwasser in %	ACN + 0,00025 % NH ₃ in %
0	70	30
3	70	30
8	5	95
12	5	95
14	70	30
22	70	30

Dabei wurden eine Säulenofentemperatur von 40 °C, eine Flussrate von 300 µL/min und ebenfalls die Kinetex XB-C18 verwendet. Der Eluent mit Ammoniak wurde am Messtag frisch hergestellt.

Tabelle 13: *Bedingungen der HPLC-Methode 3*

Zeit in min	Reinstwasser in %	ACN in %
0	90	10
5	90	10
15	5	95
21	5	95
22	90	10
30	90	10

Für die HPLC-Methode 3 wurden eine Säulenofentemperatur von 40 °C, eine Flussrate von 700 µL/min und eine Phenyl-Säule (SEPSERV, UltraSep ES, Phen, 250 x 3 mm) verwendet.

Tabelle 14: *Bedingungen der HPLC-Methode 4*

Zeit in min	Reinstwasser + 0,1 % AcOH + 10 mM NH ₄ Ac in %	MeOH + 0,1 % AcOH + 10 mM NH ₄ Ac in %
0	80	20
3	80	20
15	10	90
18	5	95
18,5	80	20
25	80	20

Die restlichen Parameter der HPLC-Methode 4 sind analog zu der HPLC-Methode 1.

Tabelle 15: *Bedingungen der HPLC-Methode 5*

Zeit in min	Reinstwasser in %	ACN in %
0	70	30
4	70	30
10	5	95
13	5	95
14	70	30
20	70	30

Dabei wurden eine Säulenofentemperatur von 40 °C, eine Flussrate von 350 µL/min und ebenfalls die Kinetex XB-C18 verwendet.

4.7 Durchführung der LC-ELISA-Messungen

Für LC-ELISA-Messungen wurden die HPLC-Methoden 1-4 unter Verwendung eines Agilent 1200 Series LC-Systems mit Autosampler, Degasser, Säulenofen, UV-Detektor und Fraktionssammler verwendet. Als Software wurde OpenLAB (CDS) ChemStation Edition for LC & LC/MS systems benutzt. Als Injektionsvolumen wurden 30 μL für den SMX- und E1-LC-ELISA und 40 μL für den CBZ-LC-ELISA verwendet. Zum Auffangen der Fraktionen kamen die in Kapitel 4.1 aufgeführte unbehandelte und glasbeschichtete Mikrotiterplatte zum Einsatz. Das Auftragungsschema von Kavitäten, welche zur Sammlung von Fraktionen und zur Auftragung von Kalibrierstandards angewendet wurde, ist in Abbildung 7 gezeigt. Die letzte Spalte blieb auf der zur Sammlung der Fraktionen verwendeten Mikrotiterplatte vakant und wurde nur auf der Platte, welche für die ELISA-Messung benutzt wurde, mit Kalibrierstandards gefüllt. Bevor die Fraktionen gesammelt wurden, wurde in die Kavitäten der Spalten 1-9 die Neutralisationspufferlösung Probenpuffer (7,6) vorgelegt. Das Volumen richtete sich nach dem für eine Fraktion gesammelten Eluatvolumen und für die Probenauftragung im ELISA notwendige Probenvolumen. Wenn im ELISA ein Probenvolumen von 100 μL /Kavität aufgetragen wurde, wie beim SMX- und E1-ELISA, betrug das verwendete Volumen in der Fraktionssammelplatte 150 μL /Kavität. Wurde beispielsweise eine Flussrate von 350 $\mu\text{L}/\text{min}$ wie für die HPLC-Methode 1 und ein Fraktionierungsintervall von 9 s gewählt, wurde pro Kavität im Mittel ein Volumen von 52,5 μL Eluat gesammelt. Es wurden daher 97,5 μL Probenpuffer (7,6) pro Kavität in die Spalten 1-9 vorgelegt. Die 8 Kalibrierstandards wurden in ihrer Analytkonzentration so gewählt, dass sie den signifikanten Konzentrationsbereich des jeweiligen ELISAs abdeckten. Für die Kalibrierstandards wurden Mischungen aus Eluent A, der jeweiligen HPLC-Methode, und Probenpuffer (7,6) hergestellt. Das Mischungsverhältnis wurde dabei so gewählt, wie es in den gesammelten Fraktionen vorlag. Das Lösungsmittel der gesammelten Fraktionen und Standards wurde im auf 30 °C angewärmten Stickstoff- oder Druckluftstrom bei einer Flussrate von etwa 40 L/min unter Anwendung einer Abdampfstation mit 96 spiralförmigen Nadeln entfernt. Dieser Vorgang dauerte, abhängig vom Volumen und Lösungsmittel, etwa 2-3 h. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte wieder mit Parafilm abgedeckt und bei 4 °C gelagert. Unmittelbar vor der ELISA-Messung, welche innerhalb von 3 Tagen erfolgte, wurden die Kavitäten jeweils mit 150 μL Reinstwasser für die SMX- und E1-LC-ELISA bzw. 200 μL Reinstwasser für den CBZ-LC-ELISA gefüllt und für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Aus diesen Kavitäten wurden dann mittels 8-Kanal-Pipette das notwendige Probenvolumen von je 100 μL bzw. 150 μL /Kavität entnommen. Dabei wurden die Pipettenspitzen nach jedem Gebrauch entsorgt. Die für die Sammlung der Fraktionen verwendeten unbehandelten Mikrotiterplatten wurden nach einmaligem Gebrauch ebenfalls

entsorgt. Die glasbeschichteten Platten wurden unter fließendem Reinstwasser viermal gespült, was etwa einer 500 000-fachen Verdünnung entsprach. Zwischen diesen vier Waschschritten wurde die Platte in der Luft ausgeschlagen. Die glasbeschichtete Platte sollte aufgrund der sensiblen Beschichtung nicht auf Oberflächen geschlagen werden, wie es typischerweise für Mikrotiterplatten angewendet wird.

4.8 Elektrochemische Synthesen

Zur Darstellung von SMX- und E1-Transformationsprodukten wurden Stammlösungen mit jeweils 10 mg/L SMX beziehungsweise Estron in einer Wasser/MeOH-Mischung (1:1, v:v) mit 0,1 % AcOH und 10 mM NH₄Ac hergestellt. Zur Bestimmung der geeigneten Spannungen wurde eine Durchflusszelle mit einem Dreielektrodensystem aus Gegen- (Kohlenstoff-beschichtetes Teflon), Referenz- (Pd/H₂) und Arbeitselektrode (Bor dotierter Diamant) bei Anwendung einer positiven Spannung und Scanrate von 20 mV/s verwendet. Die meisten Produkte konnten mittels LC-MS für SMX bei einer Spannung von 1,5 V und für Estron bei 2,0 V detektiert werden. Anschließend wurden die beiden Standardlösungen für 30 min mit den jeweiligen Spannungen behandelt. Dabei verfärbte sich die SMX-Standardlösung gelblich. Die erhaltenen Synthesemischungen wurden mittels entsprechendem LC-ELISA vermessen.

4.9 Synthese des neuartigen Tracers und Immunogens

Methyl-6-((5-methylisoxazol-3-yl)amino)-6-oxohexanoat (**1**) wurde durch Lösen von 107,9 mg 3-Amino-5-methylisoxazol (1,1 mmol) und 171,2 µL Methyladipoylchlorid in einer Mischung aus 800 µL ACN und 88,8 µL Pyridin (1,1 mmol) bei -21 °C hergestellt. Dabei wurde die Mischung 1 h bei -21 °C gerührt. Die verfestigte gelbrötliche Mischung schmolz bei Raumtemperatur. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand zweimal mit je 750 µL PBS-Pufferlösung gewaschen. Nach Trocknung im Stickstoffstrom wurden 249,2 mg **1** (1,04 mmol, 94 %) erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 1, dem Fullscan-Modus und MS-Parametern, welche für die SMX-Messungen und alle weiteren Vermessungen von Syntheseprodukten verwendet wurde, wurde für **1** eine Elutionszeit von 10,9 min und die erwarteten [M + H]⁺ m/z 241 und [M + Na]⁺ m/z 263 detektiert (Abb. A7).

6-((5-Methylisoxazol-3-yl)amino)hexan-1-ol (**2**).

249,2 mg **1** (1,04 mmol) wurden in 15 mL trockenem THF gelöst und bei 0 °C tropfenweise einer Lösung von 400 mg LiAlH₄, gelöst in 4 mL trockenem THF, hinzugegeben. Danach wurde die Lösung für 2 h bei 30 °C gerührt. Anschließend wurden vorsichtig bei 0 °C tropfenweise 6 mL, einer auf pH = 2 angesäuerten, PBS-Pufferlösung zugegeben. Die gebildete Suspension wurde bei 4000 g für 3 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Der Rückstand wurde einmal mit einer Mischung aus 4 mL THF und 2 mL PBS-Pufferlösung (pH = 2) gewaschen. Die Suspension wurde ein weiteres Mal zentrifugiert, die Überstände vereinigt und im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt. Es wurden 191,8 mg weißer Feststoff **2** (0,97 mmol, 93 %) erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 1 wurde für **2** eine Elutionszeit von 10,6 min und die erwarteten [M + H]⁺ m/z 199 und [M + Na]⁺ m/z 221 detektiert (Abbildung A8).

6-((5-Methylisoxazol-3-yl)amino)hexylacetat (**3**).

Es wurden 66,8 mg **2** (0,337 mmol) in einer Mischung aus 1 mL Essigsäure und 20 µL HCl (32 %) gelöst und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt um 99,2 mg des weißen Esters **3** (0,330 mmol, 98 %) zu erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 5 wurde für **3** eine Elutionszeit von 10,6 min und die erwarteten [M + H]⁺ m/z 241 und [M + Na]⁺ m/z 263 erhalten (Abbildung A9).

6-((4-(Acetyl-l2-azanyl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexylacetat (**4**).

Dabei wurden 99,2 mg **3** (0,330 mmol) und 80,7 mg DMAP (0,660 mmol) in 10 mL ACN gelöst. Anschließend wurden unter Rühren 10 Portionen mit jeweils 26 µL Pyridin und 77 mg N-Acetylsulfanilylchlorid (0,329 mmol), gelöst in 200 µL ACN (rötliche Lösung), über 5 h verteilt hinzugegeben. Die Lösung wurde weitere 19 h bei 40 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand zweimal mit 2 mL Reinstwasser gewaschen. Es wurden 137,7 mg eines dunkelbraunen Feststoffs **4** (0,315 mmol, 95 %) erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 5 wurde für **4** eine Elutionszeit von 12,1 min und die erwarteten [M + H]⁺ m/z 438 und [M + Na]⁺ m/z 460 detektiert (Abbildung A10).

4-(Acetyl-l2-azanyl)-N-(6-hydroxyhexyl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)benzolsulfonamid (**5**).

Dafür wurden 70,1 mg **4** (0,160 mmol) in 5 mL MeOH gelöst und 200 µL wässrige 5 %ige NaOH hinzugegeben. Die Reaktionslösung wurde 6 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Stickstoffstrom das Lösungsmittel entfernt. Der erhaltene Rückstand wurde zweimal mit 2 mL Reinstwasser gewaschen und erneut getrocknet. Es wurden 62,7 mg eines dunkelrot-braunen Feststoffs **5** (0,159 mmol, 99 %) erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 5 wurde für **5** eine

Elutionszeit von 10,4 min und die erwarteten $[M + H]^+$ m/z 396 und $[M + Na]^+$ m/z 418 detektiert (Abbildung A11).

6-((4-(Acetyl-l2-azanyl)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexansäure (**6**). Zur Synthese wurden 62,7 mg **5** (0,159 mmol) in 20 mL ACN gelöst und unter Rühren 300 mg $KMnO_4$ (1,9 mmol), gelöst in 10 mL Schwefelsäure (1 M), in 10 Portionen innerhalb von 12 h zugegeben. Anschließend wurde die Lösung für weitere 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Am nächsten Tag wurden 20 mL Methanol zur Reduktion des überschüssigen Kaliumpermanganats hinzugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt **6** wurde nicht isoliert, aber die Reaktionslösung war leicht gelblich und wurde ebenfalls mit HPLC-Methode 5 vermessen. Es zeigten sich die erwarteten $[M + H]^+$ m/z 410 und $[M + Na]^+$ m/z 432 bei einer Elutionszeit von 10,2 min (Abbildung A12).

6-((4-Amino-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexansäure (**7**).

Es wurden dem Syntheseansatz von **6** tropfenweise 7 mL Schwefelsäure (18 M) in 100 μ L Portionen innerhalb einer Stunde hinzugegeben und die Lösung für 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Zur Neutralisation wurden 12 mL der Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt und bei 0 °C unter Rühren 17 mL NaOH-Pufferlösung (3,6 g NaOH in 20 mL PBS-Pufferlösung) tropfenweise, in Portionen von 500 μ L, innerhalb von 30 min zugegeben. Dieser Vorgang wurde in gleicher Weise für den Rest des Reaktionsansatzes durchgeführt. Der Neutralisationspunkt war am Auftreten eines voluminösen weißen Niederschlages erkennbar. Die 4 neutralisierten Lösungen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt. Der weiße Rückstand, der hauptsächlich aus verschiedenen Sulfaten bestand, wurde fünfmal mit 20 mL ACN gewaschen, bis nur noch farbloser Extrakt aus dem Salzkückstand extrahiert wurde. Die Extrakte wurden vereinigt und im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurde ein dunkelbraunes Produkt erhalten, welches neben **7** auch den entsprechenden Methylester **8** zeigte. Unter Verwendung der HPLC-Methode 5 wurde für **7** eine Elutionszeit von 10,2 min und die erwarteten $[M + H]^+$ m/z 368 und $[M + Na]^+$ m/z 390 erhalten (Abbildung A13).

Methyl-6-((4-amino-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexanoat (**8**).

Die bei der Synthese von **7** erhaltene Produktmischung wurde in 10 mL MeOH gelöst und 500 μ L H_2SO_4 (18 M) hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde anschließend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt um 81,3 mg **8** (0,213 mmol, 134 %) zu erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 5 wurde für **8** eine Elutionszeit von 11,8 min und die erwarteten $[M + H]^+$ m/z 382 und $[M + Na]^+$ m/z 404 detektiert (Abbildung A14).

Methyl-6-((4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexanoat (**9**).

Es wurden 20,1 mg **8** (0,053 mmol) in 1,5 mL ACN gelöst und 30 µL Pyridin hinzugegeben. Die Lösung wurde auf -21 °C abgekühlt. Unter Rühren wurden 27,7 mg Fmoc-Cl (0,107 mmol) gelöst in 200 µL ACN tropfenweise bei -21 °C hinzugegeben und die Reaktionslösung für weitere 3 h bei -21 °C gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung auf Raumtemperatur erwärmt und für weitere 2 h gerührt. Danach wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt und der Rückstand zweimal mit 2 mL Reinstwasser gewaschen. Das dunkelbraune Produkt **9** zeigte unter Verwendung der HPLC-Methode 5 eine Elutionszeit von 14,3 min und die erwarteten $[M + H]^+$ m/z 604 und $[M + Na]^+$ m/z 626 (Abb. A15).

6-((4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexansäure (**10**).

Zur Synthese von **10** wurde die Reaktionsmischung von **9** in 2 mL einer Mischung aus Reinstwasser und THF (1:1, v/v) gelöst und 60 µL HCl (32 %) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 5 Tage bei 35 °C gerührt. Anschließend wurde die Mischung mittels HPLC unter Anwendung der HPLC-Methode 5 aufgereinigt. Die gesammelten Fraktionen wurden vereinigt und bis zur Massenkonzanz im Stickstoffstrom getrocknet. Es wurden 9,9 mg eines rotbraunen Feststoffs **10** (0,017 mmol, 32 %) erhalten. Unter Verwendung der HPLC-Methode 5 wurde für **10** eine Elutionszeit von 13,3 min und die erwarteten MRM-Übergänge 590 → 314, 330 und 378 erhalten (Abbildung A16). Zudem wurde das Produkt mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie vermessen (Abbildung A17). Durch Anwendung von verschiedenen Messmodi wie H, H-COSY, HSQC und HMBC war eine eindeutige Zuordnung der NMR-Signale zu den Atomen möglich (Abbildung A18).

¹H-NMR (400 MHz, THF-d₈, 25 °C) δ in ppm = 9.25 (1H, s), 7.79 (2H, d, ³J_{HH} = 7,5 Hz), 7.65 (4H, m), 7.59 (2H, d, ³J_{HH} = 8,6 Hz), 7.36 (2H, t, ³J_{HH} = 7,5 Hz), 7.29 (2H, t, ³J_{HH} = 7,4 Hz), 6.43 (1H, s), 4.60 (2H, d, ³J_{HH} = 6,2 Hz), 4.28 (1H, t, ³J_{HH} = 6,2 Hz), 3.70 (2H, t, ³J_{HH} = 7,1 Hz), 2.33 (3H, s), 2.20 (2H, t, ³J_{HH} = 7,2 Hz), 1.67 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.36 (2H, m). ¹³C-NMR (100 MHz, THF-d₈, 25 °C) δ in ppm = 174.2, 170.7, 160.4, 153.9, 145.0, 144.8, 142.2, 132.7, 128.9, 128.2, 127.6, 125.5, 120.5, 118.3, 98.5, 67.7, 48.9, 48.0, 33.9, 28.5, 26.9, 24.8, 12.1.

6-((4-Amino-N-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexansäure (**11**).

Zur Darstellung von **11** wurden 0,3 mg **10** (0,51 µmol) in 250 µL THF gelöst und die Fmoc-Schutzgruppe durch Zusatz von 50 µL Reinstwasser und 50 µL TEA unter Rühren bei 40 °C innerhalb von 5 h entfernt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Stickstoffstrom entfernt.

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-6-((4-amino-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexanoat (**12**).

Es wurde der Rückstand aus der Reaktion zur Bildung von **11** in 100 µL THF gelöst. Die Lösung wurde zu einer Mischung aus etwa 0,1 mg DCC (0,48 µmol) und etwa 0,1 mg NHS (0,87 µmol) hinzugegeben und für 48 h bei Raumtemperatur gerührt um den Aktivester **12** zu erhalten. Anschließend wurde die Lösung im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingeeengt.

6-((4-Amino-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexanamid-*N*-POD (**13**).

Der Aktivester **12** wurde in 100 µL DMA gelöst und unter Rühren bei 0 °C zu 2,5 mg Meerrettichperoxidase (POD), gelöst in 100 µL NaHCO₃ (0,1 M; pH = 8,1), zugetropft. Die rote Reaktionslösung wurde weitere 4 h bei 0 °C gerührt und über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde der Ansatz mittels einer PD-10-Säule aufgereinigt. Dazu wurde die Säule zunächst mit 25 mL PBS-Pufferlösung (1:10 verdünnt mit Reinstwasser) konditioniert. Anschließend wurde der Synthesansatz aufgetragen und die Säule mit PBS-Pufferlösung (1:10 verdünnt mit Reinstwasser) eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von 3 Tropfen (etwa 150 µL/Kavität) in einer UV-Star-Platte aufgefangen. Es wurden die Extinktionen bei 405 nm, 620 nm und 280 nm mittels Mikrotiterplatten-Spektrometer für die gesammelten Fraktionen vermessen (Abbildung A4). Die Fraktionen 12-14 wurden vereinigt und mittels MALDI-TOF-Analyse vermessen (Abbildung 32).

2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl-6-((4-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexanoat (**14**).

Es wurden 0,3 mg **10** (0,51 µmol), etwa 0,1 mg DCC (0,48 µmol) und etwa 0,1 mg NHS (0,87 µmol) in 150 µL THF gelöst und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Die erhaltene Suspension wurde 5 min bei 9660 g zentrifugiert und der Überstand im Stickstoffstrom getrocknet um **14** zu erhalten.

(9H-fluoren-9-yl)methyl(4-(*N*-(6-(amino-BSA)-6-oxohexyl)-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)sulfamoyl)phenyl)carbamate (**15**).

Zur Synthese wurde **14** in 200 µL DMSO gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur 6,0 mg Rinderserumalbumin (BSA), gelöst in 400 µL Reinstwasser, zugetropft. Anschließend wurden 7 µL 4-Methylmorpholin zugegeben und die Reaktionslösung 4 h bei Raumtemperatur gerührt, bis mittels LC-MS kein Aktivester **14** in der Reaktionslösung mehr nachweisbar war.

6-((4-Amino-*N*-(5-methylisoxazol-3-yl)phenyl)sulfonamido)hexanamid-*N*-BSA (**16**).

Dem Reaktionsansatz zur Synthese von **15** wurden 50 µL TEA hinzugesetzt und der Ansatz für 5 h bei 40 °C gerührt. Die Reaktionsmischung wurde analog zu **13** mittels

PD-10-Säule aufgereinigt und die Fraktionen 11-18 vereinigt und mittels MALDI-TOF-Analyse vermessen (Abbildung A5).

4.10 Synthese von SMX-*N*⁴-Glucuronid

Zur Darstellung von SMX-*N*⁴-Glucuronid wurden 5 µL Essigsäure zu 5 mL ACN gegeben und unter Rühren über 500 mg Molsieb (3Å) über Nacht getrocknet. Anschließend wurden 50 mg SMX (0,2 mmol), 160 mg Acetobromo- α -D-glucuronsäuremethylester (0,4 mmol) und 110 mg Silbercarbonat (0,4 mmol) unter Argon zugegeben. Nach 30 min verfärbte sich die Suspension deutlich dunkel. Nach 3 Tagen wurden erneut 2 Äquivalente Acetobromo- α -D-glucuronsäuremethylester und Silbercarbonat hinzugegeben und die schwarze Suspension weiterhin bei Raumtemperatur gerührt. Nach 5 Tagen wurde die Reaktion durch Luftkontakt gestoppt und zur Entschützung der Methylester mit 1 mL NaOH (5 %) versetzt. Der Ansatz wurde für 2 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck bei 40 °C auf 1 mL eingeeengt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 9660 g wurde der Überstand mittels LC-MS/MS vermessen. Dazu wurden die analogen Parameter wie für die Quantifizierung von SMX verwendet.

4.11 Durchführung der LC-MS/MS-Messungen

In diesem Abschnitt sollen die für die LC-MS/MS-Messungen verwendeten Parameter genannt werden. Es wurde ein Agilent 1260 Infinity LC-System mit Degasser, Autosampler, Säulenofen und UV-Detektor verwendet. Zudem wurde als analytische Säule ebenfalls die Kinetex XB-C18 mit UHPLC-Vorsäule verwendet, jedoch nicht dieselbe. Es traten daher zeitliche Verschiebungen zwischen den Elutionszeiten im LC-ELISAgramm und den LC-MS/MS-Spektren von bis zu etwa 20 s auf. Für die massenspektrometrischen Messungen wurde ein AB Sciex 6500 Triple-Quadrupol Massenspektrometer mit Elektrospray-Ionisation an das HPLC-System gekoppelt. Zur Steuerung wurde die Software Analyst (Version 1.6.2) und zur Auswertung der Spektren die Software MultiQuant (Version 3.0) verwendet.

4.11.1 Quantifizierung von Analyten

Für die Quantifizierung der Analyten wurde ein Injektionsvolumen von 10 µL gewählt. Um Matrixeffekte zu reduzieren, wurden die angereicherten Umweltproben mit Reinstwasser verdünnt. Klärwerkszulaufproben wurden 10-fach angereichert und

Klärwerksablaufproben 50-fach angereichert vermessen. Dabei wurde für das Signal des SMX-d4 eine matrixbedingte Suppression von durchschnittlich etwa 40 % und für das Signal des E1-d4 von etwa 50 % erhalten. Zur Quantifizierung der Gehalte an SMX in den Oberflächenwasserproben wurden diese 400-fach angereichert vermessen. Zur Bestimmung des Gehaltes an E1 wurden die Teltowkanalproben auf eine 333-fache und die Havelproben auf eine 500-fache Anreicherung verdünnt. Zu den verdünnten Proben wurde eine Menge an Isotopenstandard dotiert, dass sich eine Konzentration von 10 µg/L SMX-d4 bzw. 2 µg/L E1-d4 ergab. Für die Quantifizierung der Gehalte an SMX wurden Kalibrierfunktionen aufgenommen, wobei die Konzentration an SMX-d4 stets 10 µg/L betrug und die SMX-Konzentration zwischen 1 µg/L und 120 µg/L variierte. Zur Erstellung der Kalibrierfunktion von *N*⁴-Acetyl-SMX, wurde ebenfalls eine Konzentration von 10 µg/L SMX-d4 gewählt und eine *N*⁴-Acetyl-SMX-Konzentration im Bereich von 0,4-50 µg/L verwendet. In den Kalibratoren der Kalibrierfunktion von E1 betrug die E1-d4-Konzentration stets 2 µg/L und die E1-Konzentration lag im Bereich von 0,2-5 µg/L. Für die Quantifizierung von CBZ wurden für die Kalibratoren Konzentrationen im Bereich von 0,02-0,5 µg/L CBZ verwendet. Zur Vermessung der Proben wurden verschiedene Parameter verwendet, welche nach Analyten getrennt benannt werden sollen. Es wurde bei allen Methoden mit einer Unit Auflösung gemessen. Zur Quantifizierung von Sulfamethoxazol bzw. *N*⁴-Acetyl-SMX wurde die HPLC-Methode 1 verwendet. Wesentliche Parameter der massenspektrometrischen Messung sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: *Daten für die massenspektrometrische Quantifizierung von Sulfamethoxazol und *N*⁴-Acetyl-SMX*

Stoff	MRM-Übergang	CE in V	DP in V	EP in V	CXP in V
SMX	254 → 92 (Quantifier)	35	11	10	12
	254 → 108 (Qualifier 1)	31	11	10	14
	254 → 156 (Qualifier 2)	27	11	10	12
SMX-d4	258 → 96 (Quantifier)	35	11	10	12
	258 → 112 (Qualifier 1)	31	11	10	14
	258 → 160 (Qualifier 2)	27	11	10	12
<i>N</i> ⁴ -Acetyl-SMX	296 → 134 (Quantifier)	35	11	10	12
	296 → 198 (Qualifier 1)	27	11	10	12
	296 → 136 (Qualifier 2)	27	11	10	12

CE - Kollisionsenergie, DP - Declusteringpotential, EP - Eingangspotential, CXP - Kollisionszellenaustrittspotential

Für die Ionisation wurden eine Ionenspray-Spannung von 5000 V und eine Temperatur von 550 °C gewählt. Als Druck für das Curtain Gas wurden 35 psi, für das Vernebelungsgas (GS1) 50 psi, für das Turbogas (GS2) 70 psi und für das Kollisionsgas 10 psi verwendet. Als dwell time wurden für die MRM-Übergänge von

SMX 20 ms und für die restlichen 189 MRM-Übergänge 10 ms verwendet. Als pause time wurden 5 ms gewählt. Es ergab sich damit eine cycle time (wiederkehrender zeitlicher Abstand in dem der gleiche MRM-Übergang gemessen wird) von 2,9 s.

Zur Quantifizierung von Estron wurde die HPLC-Methode 2 verwendet und die in Tabelle 17 aufgeführten Parameter.

Tabelle 17: Daten für die massenspektrometrische Quantifizierung von Estron

Stoff	MRM-Übergang	CE in V	DP in V	EP in V	CXP in V
Estron	269 → 145 (Quantifier)	- 48	- 80	- 10	-16
	269 → 143 (Qualifier 1)	- 70	- 80	- 10	-16
	269 → 183 (Qualifier 2)	- 50	- 80	- 10	-16
Estron-d4	273 → 147 (Quantifier)	- 48	- 80	- 10	-16
	273 → 145 (Qualifier 1)	- 70	- 80	- 10	-16
	273 → 187 (Qualifier 2)	- 50	- 80	- 10	-16

CE - Kollisionsenergie, DP - Declusteringpotential, EP - Eingangspotential, CXP - Kollisionszellenaustrittspotential

Es wurden für die Ionisation eine Ionenspray-Spannung von -4500 V und eine Temperatur von 400 °C gewählt. Als Druck für das Curtain Gas wurden 35 psi, für das Vernebelungsgas (GS1) 62 psi, für das Turbogas (GS2) 62 psi und für das Kollisionsgas 8 psi verwendet. Für alle 106 MRM-Übergänge wurde eine dwell time von 10 ms gewählt. Als pause time wurden ebenfalls die standardmäßigen 5 ms verwendet. Die cycle time (wiederkehrender zeitlicher Abstand in dem der gleiche MRM-Übergang gemessen wird) betrug 1,6 s.

Zur Messung von Carbamazepin wurde die HPLC-Methode 4 verwendet. Die zur Vermessung von CBZ verwendeten Parameter sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Daten für die massenspektrometrische Quantifizierung von Carbamazepin

Stoff	MRM-Übergang	CE in V	DP in V	EP in V	CXP in V
Carbamazepin	237 → 194 (Quantifier)	30	60	10	14
	237 → 179 (Qualifier 1)	50	60	10	12

CE - Kollisionsenergie, DP - Declusteringpotential, EP - Eingangspotential, CXP - Kollisionszellenaustrittspotential

Zudem wurden eine Ionenspray-Spannung von 4500 V und eine Temperatur von 400 °C gewählt. Als Druck für das Curtain Gas wurden 35 psi, für das Vernebelungsgas (GS1) 62 psi, für das Turbogas (GS2) 62 psi und für das Kollisionsgas 6 psi verwendet. Als dwell time wurden jeweils 75 ms gewählt.

4.11.2 Suspected-Target-Screening

Für das Suspected-Target-Screening wurden die zu erwartenden MRMs für Stoffe, welche nicht als Standard vorlagen, errechnet. Dabei wurden die zu den SMX-MRM-Übergängen analogen Kollisionsenergien und übrigen Parameter verwendet. Für die Suche nach Kreuzreaktanden im E1-ELISA wurde entsprechend analog vorgegangen. Es erscheint naheliegend, dass die verwendeten Parameter nicht für alle Sulfonamide bzw. Estrogene die optimalen Bedingungen darstellen. Jedoch kann nicht auf einen unbekannten Stoff hin optimiert werden. Aufgrund der vermutlich hohen strukturellen Ähnlichkeit, können ähnliche Bedingungen für die Ionisation und Bildung der Produkt-Ionen vermutet werden.

Für die Suche des Kreuzreaktanden im SMX-ELISA, welcher im LC-ELISAGramm bei etwa 6 min erkannt wurde, wurden ausgehend von Abbildung 36 in Summe 74 MRM-Übergänge im positiven Ionisationsmodus und 43 Übergänge im negativen Ionisationsmodus erhalten. Für den Fullscan-Modus im positiven Ionisationsmodus wurden die gleichen Ionisationsparameter wie für die Quantifizierung von SMX verwendet. Das Fullscan-Spektrum wurde unter Verwendung des Quadrupols 1 aufgenommen. Für die Messung der Quasi-Molekülionen der Produkt-Ionen m/z 92, 108 und 156 Da wurde ein Gradient der Kollisionsenergie von 20-40 V gewählt. Diese Kollisionsenergien liegen im Bereich der für SMX erhaltenen Kollisionsenergien, jedoch erhöht der Gradient die Chance auch von SMX verschiedene Quasi-Molekülionen zu detektieren. Es wurde berücksichtigt, dass die Produkt-Ionen nicht in protonierter Form, sondern auch als Natriumaddukt vorliegen konnten und so Produkt-Ionen mit einem m/z 114, 130 und 178 Da entstehen konnten. Einen Gradienten von 20-40 V in der Kollisionsenergie wurde auch im Neutralverlustmodus mit Verlusten von m/z 98, 146 und 162 Da sowie für die doppelt geladenen Spezies mit Verlusten von m/z 49, 73 und 81 Da getestet. Im negativen Ionisationsmodus wurden die gleichen Parameter wie im positiven Ionisationsmodus verwendet, lediglich die Ionenspray-Spannung wurde auf - 4500 V, DP auf - 11 V, EP auf - 10 V und CXP auf - 11 V geändert. SMX zeigte im negativen Ionisationsmodus im Fullscan-Spektrum ein m/z von 252 Da. Bei Anwendung eines Gradienten der Kollisionsenergie von - 20 bis - 40 V wurden die Fragmente m/z 156 Da und 92 Da erhalten. Es ergaben sich daher Neutralverluste von m/z 96 Da und 160 Da bzw. für die doppelt geladenen Fragmente Verluste von m/z 48 Da und 80 Da. Es wurde manuell nach positiven Signalen in den Massenspektren im Elutionsbereich von 5,5-6,5 min gesucht. Für alle Messungen wurde ein m/z -Bereich von 50-800 Da untersucht, wobei als scan rate 1000 Da/s gewählt wurde.

5. Literatur

1. Arrhenius S. (1907) Immunochemie. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft.
2. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man. *J Clin Invest.* 1960;39(7):1157-1175.
3. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Elisa) Quantitative Assay of Immunoglobulin-G. *Immunochemistry.* 1971;8(9):871-874.
4. Van Weemen B, Schuurs AHW. Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. *Febs Lett.* 1971;15(3):232-236.
5. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Ventura A, Not T. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: An innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(5):1253-1257.
6. Griffin JFT, Spittle E, Rodgers CR, Liggett S, Cooper M, Bakker D, Bannantine JP. Immunoglobulin G1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in red deer (*Cervus elaphus*). *Clin Diagn Lab Immun.* 2005;12(12):1401-1409.
7. Porcelli B, Ferretti F, Vindigni C, Terzuoli L. Assessment of a Test for the Screening and Diagnosis of Celiac Disease. *J Clin Lab Anal.* 2016;30(1):65-70.
8. Wild D (2005) The Immunoassay Handbook. Third edition, Elsevier Ltd.
9. Marquette CA, Blum LJ. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems. *Biosens Bioelectron.* 2006;21(8):1424-1433.
10. Suri CR, Boro R, Nangia Y, Gandhi S, Sharma P, Wangoo N, Rajesh K, Shekhawat GS. Immunoanalytical techniques for analyzing pesticides in the environment. *Trends Anal Chem.* 2009;28(1):29-39.
11. Rodbard D, Frazier GR. Statistical analysis of radioligand assay data. *Methods Enzymol.* 1975;37:3-22.
12. Coico R, Sunshine G. (2015) Immunology: A Short Course. seventh edition, John Wiley & Sons. Ltd. (Seite 36).
13. Köhler G, Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256(5517):495-497.
14. Farré M, Kantiani L, Barceló D. Advances in immunochemical technologies for analysis of organic pollutants in the environment. *Trends Anal Chem.* 2007;26(11):1100-1112.
15. Sturgeon CM, Viljoen A. Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. *Ann Clin Biochem.* 2011;48:418-432.
16. Wang XD, Lin H, Sui JX, Cao LM. The effect of fish matrix on the enzyme-linked immunosorbent assay of antibiotics. *J Sci Food Agr.* 2013;93(7):1603-1609.
17. Rehan M, Younus H. Effect of organic solvents on the conformation and interaction of catalase and anticatalase antibodies. *Int J Biol Macromol.* 2006;38(3-5):289-295.
18. Reverberi R, Reverberi L. Factors affecting the antigen-antibody reaction. *Blood Transfus.* 2007;5(4):227-240.
19. Hoffmann H, Baldofski S, Hoffmann K, Flemig S, Silva CP, Esteves VI, Emmerling F, Panne U, Schneider RJ. Structural considerations on the selectivity of an immunoassay for sulfamethoxazole. *Talanta.* 2016;158:198-207.
20. Silva CP, Lima DLD, Schneider RJ, Otero M, Esteves VI. Development of ELISA methodologies for the direct determination of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in complex aqueous matrices. *J Environ Manage.* 2013;124:121-127.
21. Farré M, Kuster M, Brix R, Rubio F, López de Alda MJL, Barceló D. Comparative study of an estradiol enzyme-linked immunosorbent assay kit, liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and ultra performance liquid chromatography-

- quadrupole time of flight mass spectrometry for part-per-trillion analysis of estrogens in water samples. *J Chromatogr A*. 2007;1160(1-2):166-175.
22. Byer JD, Struger J, Klawunn P, Todd A, Sverko E. Low Cost Monitoring of Glyphosate in Surface Waters Using the ELISA Method: An Evaluation. *Environ Sci Technol*. 2008;42(16):6052-6057.
23. Bertol E, Vaiano F, Borsotti M, Quercioli M, Mari F. Comparison of Immunoassay Screening Tests and LC-MS-MS for Urine Detection of Benzodiazepines and Their Metabolites: Results of a National Proficiency Test. *J Anal Toxicol*. 2013;37(9):659-664.
24. Dzuman Z, Vaclavikova M, Polisenska I, Veprikova Z, Fenclova M, Zachariasova M, Hajslova J. Enzyme-linked immunosorbent assay in analysis of deoxynivalenol: investigation of the impact of sample matrix on results accuracy. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(2):505-514.
25. Heussner AH, Winter I, Altaner S, Kamp L, Rubio F, Dietrich DR. Comparison of two ELISA-based methods for the detection of microcystins in blood serum. *Chem-Biol Interact*. 2014;223:10-17.
26. Steimer W. Performance and Specificity of Monoclonal Immunoassays for Cyclosporine Monitoring: How Specific Is Specific? *Clin Chem*. 1999;45(3):371-381.
27. Abraham GE. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1969;29(6):866-870.
28. Zühlke J, Knopp D, Nießner R. Determination of 1-nitropyrene with enzyme-linked immunosorbent assay versus high-performance column switching technique. *J Chromatogr A*. 1998;807(2):209-217.
29. Peruski AH, Johnson LH, Peruski LF. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J Immunol Methods*. 2002;263(1-2):35-41.
30. Sheng W, Xia XF, Wei KY, Li J, Li QX, Xu T. Determination of Marbofloxacin Residues in Beef and Pork with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Agric Food Chem*. 2009;57(13):5971-5975.
31. Lima DLD, Silva CP, Schneider RJ, Esteves VI. Development of an ELISA procedure to study sorption of atrazine onto a sewage sludge-amended luvisol soil. *Talanta*. 2011;85(3):1494-1499.
32. Silva CP, Lima DLD, Schneider RJ, Otero M, Esteves VI. Evaluation of the anthropogenic input of caffeine in surface waters of the north and center of Portugal by ELISA. *Sci Total Environ*. 2014;479:227-232.
33. Valentini F, Compagnone D, Gentili A, Palleschi G. An electrochemical ELISA procedure for the screening of 17 β -estradiol in urban waste waters. *Analyst*. 2002;127(10):1333-1337.
34. Deng AP, Himmelsbach M, Zhu QZ, Frey S, Sengl M, Buchberger W, Niessner R, Knopp D. Residue Analysis of the Pharmaceutical Diclofenac in Different Water Types Using ELISA and GC-MS. *Environ Sci Technol*. 2003;37(15):3422-3429.
35. Bahlmann A, Falkenhagen J, Weller MG, Panne U, Schneider RJ. Cetirizine as pH-dependent cross-reactant in a carbamazepine-specific immunoassay. *Analyst*. 2011;136(7):1357-1364.
36. Sullivan JJ, Goh KS. Evaluation and validation of a commercial ELISA for diazinon in surface waters. *J Agric Food Chem*. 2000;48(9):4071-4078.
37. Degelmann P, Wenger J, Niessner R, Knopp D. Development of a Class-Specific ELISA for Sulfonylurea Herbicides (Sulfuron Screen). *Environ Sci Technol*. 2004;38(24):6795-6802.

38. van Weeman BK, Schuurs AH. The influence of heterologous combinations of antiserum and enzyme-labeled estrogen on the characteristics of estrogen enzyme-immunoassays. *Immunochemistry*. 1975;12(8):667-670.
39. Harrison RO, Goodrow MH, Hammock BD. Competitive-Inhibition Elisa for the S-Triazine Herbicides: Assay Optimization and Antibody Characterization. *J Agric Food Chem*. 1991;39(1):122-128.
40. Karu AE, Goodrow MH, Schmidt DJ, Hammock BD, Bigelow MW. Synthesis of Haptens and Derivation of Monoclonal-Antibodies for Immunoassay of the Phenylurea Herbicide Diuron. *J Agric Food Chem*. 1994;42(2):301-309.
41. Mercader JV, Montoya A. Development of Monoclonal ELISAs for Azinphos-methyl. 1. Hapten Synthesis and Antibody Production. *J Agric Food Chem*. 1999;47(3):1276-1284.
42. Paknejad M, Rasaee MJ, Mohammadnejad J, Pouramir M, Rajabibazl M, Kakhki M. Development and characterization of enzyme-linked immunosorbent assay for aflatoxin B-1 measurement in urine sample using penicillinase as label. *J Toxicol Sci*. 2008;33(5):565-573.
43. Wang ZH, Zhang HY, Ni HJ, Zhang SX, Shen JZ. Development of a highly sensitive and specific immunoassay for enrofloxacin based on heterologous coating haptens. *Anal Chim Acta*. 2014;820:152-158.
44. Chen JH, Shanin IA, Lv SW, Wang Q, Mao CB, Xu ZL, Sun YM, Wu Q, Eremin SA, Lei HT. Heterologous strategy enhancing the sensitivity of the fluorescence polarization immunoassay of clinafloxacin in goat milk. *J Sci Food Agr*. 2016;96(4):1341-1346.
45. Song Y, Ge Y, Zhang Y, Liu B, Lu Y, Dong TT, Wang S. Hapten synthesis and enzyme-linked immunosorbent assay for phosmet residues: assay optimization and investigation of matrix effects from different food samples. *Anal Bioanal Chem*. 2009;393(8):2001-2008.
46. Beloglazova NV, Eremin SA. Design of a sensitive fluorescent polarization immunoassay for rapid screening of milk for cephalexin. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407(28):8525-8532.
47. Zhang Q, Wang L, Ahn KC, Sun Q, Hu B, Wang J, Liu F. Hapten heterology for a specific and sensitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for organophosphorus insecticide fenthion. *Anal Chim Acta*. 2007;596(2):303-311.
48. Wang ZH, Li YH, Liang X, Zhang SX, Shi WM, Shen JZ. Forcing immunoassay for sulfonamides to higher sensitivity and broader detection spectrum by site heterologous hapten inducing affinity improvement. *Anal Methods*. 2013;5(24):6990-7000.
49. Nielen MW, Elliott CT, Boyd SA, Courtheyn D, Essers ML, Hooijerink HH, van Bennekom EO, Fuchs RE. Identification of an unknown β -agonist in feed by liquid chromatography/bioassay/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry with accurate mass measurement. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2003;17(14):1633-1641.
50. Lardinois OM, Detweiler CD, Tomer KB, Mason RP, Deterding LJ. Identifying the site of spin trapping in proteins by a combination of liquid chromatography, ELISA, and off-line tandem mass spectrometry. *Free Radical Bio Med*. 2008;44(5):893-906.
51. Song MF, Li YS, Ootsuyama Y, Kasai H, Kawai K, Ohta M, Eguchi Y, Yamato H, Matsumoto Y, Yoshida R, Ogawa Y. Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. *Free Radical Bio Med*. 2009;47(1):41-46.

52. Hradecká V, Novák O, Havlíček L, Strnad M. Immunoaffinity chromatography of abscisic acid combined with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2007;847(2):162-173.
53. Weiler EW. An enzyme-immunoassay for *cis*(+)-abscisic acid. *Physiologia Plantarum*. 1982;54(4):510-514.
54. Mertens R, Deus-Neumann B, Weiler EW. Monoclonal antibodies for the detection and quantitation of the endogenous plant growth regulator, abscisic acid. *Febs Lett*. 1983;160(1-2):269-272.
55. Badenoch-Jones J, Letham DS, Parker CW, Rolfe BG. Quantitation of Cytokinins in Biological Samples Using Antibodies against Zeatin Riboside. *Plant Physiology*. 1984;75(4):1117-1125.
56. Zhou CQ, Wang QS. Epitopic Peptides Identified by LC-ELISA and LC-MS. *Chromatographia*. 2011;73(9-10):879-887.
57. Richtlinie 2002/657/EG der Europäischen Kommission (<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=DE>) abgerufen am 28.03.2017.
58. Bergmann A, Fohrmann R, Weber F-A. Zusammenstellung von Monitoringdaten zu Umweltkonzentrationen von Arzneimitteln. Bericht für das Umweltbundesamt, Forschungskennzahl 360 14 013 UBA-Texte 66 (<https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/461/publikationen/4188.pdf>) abgerufen am 28.03.2017.
59. Le-Minh N, Stuetz RM, Khan SJ. Determination of six sulfonamide antibiotics, two metabolites and trimethoprim in wastewater by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2012;89:407-416.
60. Yan Q, Gao X, Chen YP, Peng XY, Zhang YX, Gan XM, Zi CF, Guo JS. Occurrence, fate and ecotoxicological assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants in Chongqing, the Three Gorges Reservoir Area. *Sci Total Environ*. 2014;470-471:618-630.
61. Hartig C, Storm T, Jekel M. Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 1999;854(1-2):163-173.
62. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol*. 2002;36(6):1202-1211.
63. Dinh QT, Alliot F, Moreau-Guigon E, Eurin J, Chevreuil M, Labadie P. Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta*. 2011;85(3):1238-1245.
64. Jiang Y, Li M, Guo C, An D, Xu J, Zhang Y, Xi B. Distribution and ecological risk of antibiotics in a typical effluent-receiving river (Wangyang River) in North China. *Chemosphere*. 2014;112:267-274.
65. Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water. *Environ Sci Technol*. 2009;43(3):597-603.
66. Schaidt LA, Rudel RA, Ackerman JM, Dunagan SC, Brody JG. Pharmaceuticals, perfluorosurfactants, and other organic wastewater compounds in public drinking water wells in a shallow sand and gravel aquifer. *Sci Total Environ*. 2014;468-469:384-393.
67. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz KL. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ*. 1999;225(1-2):109-118.

68. Lee BL, Delahunty T, Safrin S. The Hydroxylamine of Sulfamethoxazole and Adverse Reactions in Patients with Acquired-Immunodeficiency-Syndrome. *Clin Pharmacol Ther.* 1994;56(2):184-189.
69. Vree TB, van der Ven AJ, Verwey-van Wissen CP, van Ewijk-Beneken Kolmer EW, Swolfs AE, van Galen PM, Amadajais-Groenen H. Isolation, identification and determination of sulfamethoxazole and its known metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications.* 1994;658(2):327-340.
70. Majewsky M, Wagner D, Delay M, Bräse S, Yargeau V, Horn H. Antibacterial Activity of Sulfamethoxazole Transformation Products (TPs): General Relevance for Sulfonamide TPs Modified at the para Position. *Chem Res Toxicol.* 2014;27(10):1821-1828.
71. Schwabe U. (2007) *Arzneiverordnungs-Report 2006*, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
72. Faigle JW, Brechbühler S, Feldmann KF, WJ R. The biotransformation of carbamazepine. *Epileptic seizures - behaviour - pain: University Park Press.* 1976:127-140.
73. Richter WJ, Kriemler P, JW. F. Newer aspects of the biotransformation of carbamazepine: structural characterization of highly polar metabolites. *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine New York: Plenum Press.* 1978:1-14.
74. Lertratanakoon K, Horning MG. Metabolism of Carbamazepine. *Drug Metab Dispos.* 1982;10(1):1-10.
75. Pinnekamp J, Merkel W. (2008) Abschlussbericht zu den Forschungsvorhaben: "Senkung des Anteils organischer Spurenstoffe in der Ruhr durch zusätzliche Behandlungsstufen auf kommunalen Kläranlagen - Gütebetrachtungen", Vergabe-Nr. 07/111.1 (IV-7-042 1 D 7), ISA RWTH Aachen IWW, Mülheim an der Ruhr.
76. Kracht J. (1969) Oestrogene Hypophysentumoren: 15. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, ISBN: 3642951279.
77. Jalabert B, Billard R, Chevassus B. Preliminary experiments on sex control in trout: production of sterile fishes and simultaneous self-fertilizable hermaphrodites. *Ann Biol Anim, Biochim, Biophys.* 1975;15(1):19-28.
78. Fredj SB, Nobbs J, Tizaoui C, Monser L. Removal of estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), and 17 α -ethinylestradiol (EE2) from wastewater by liquid-liquid extraction. *Chem Eng J.* 2015;262:417-426.
79. Salste L, Leskinen P, Virta M, Kronberg L. Determination of estrogens and estrogenic activity in wastewater effluent by chemical analysis and the bioluminescent yeast assay. *Sci Total Environ.* 2007;378(3):343-351.
80. Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment.* 1999;225(1-2):91-99.
81. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *The Science of the Total Environment.* 1999;225(1-2):81-90.
82. Routledge EJS, D.; Desbrow, C.; Brighty, G. C.; Waldock, M.; Sumpter, J. P. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environ Sci Technol.* 1998;32:1559-1565.
83. Manickum T, John W. The current preference for the immuno-analytical ELISA method for quantitation of steroid hormones (endocrine disruptor compounds) in wastewater in South Africa. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(17):4949-4970.

84. Giton F, Sirab N, Franck G, Gervais M, Schmidlin F, Ali T, Allory Y, Taille A, Vacherot F, Loric S, Fiet J. Evidence of estrone-sulfate uptake modification in young and middle-aged rat prostate. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015;152:89-100.
85. Shrestha SL, Casey FX, Hakk H, Smith DJ, Padmanabhan G. Fate and Transformation of an Estrogen Conjugate and Its Metabolites in Agricultural Soils. *Environ Sci Technol*. 2012;46(20):11047-11053.
86. Hall D. (2001) Nutritional Influences on Estrogen Metabolism. *Applied Nutritional Science Reports*, Seite 1-8 (www.afmcp-sa.com/ansr/MET451%20Endocrine%20ANSR.pdf) abgerufen am 28.03.2017.
87. Ekins RP. The "Precision Profile": Its use in RIA assessment and design. *The Ligand Quarterly*. 1981;4(2):33-44.
88. Hayashi Y, Matsuda R, Maitani T, Imai K, Nishimura W, Ito K, Maeda M. Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA. *Anal Chem*. 2004;76(5):1295-1301.
89. Metzger S. (2010) Einsatz von Pulveraktivkohle zur weitergehenden Reinigung von kommunalem Abwasser. Oldenbourg-Industrieverlag, München, ISBN: 978-3-8356-3231-8.
90. Rodrigues A, Brito A, Janknecht P, Proença MF, Nogueira R. Quantification of humic acids in surface water: effects of divalent cations, pH, and filtration. *J Environ Monit*. 2009;11(2):377-382.
91. Dykstra MJ, Reuss LE. (2003) Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting. Second Edition, Kluwer Academic/Plenum Publishers, ISBN 0-306-47749-1 (Seite 224).
92. Lehmann S, Teunissen CE. (2016) Biomarkers of Alzheimers' Disease: The Present and the Future. *Frontiers in Neurology & Frontiers in Neuroscience*, ISBN 978-2-88945-041-1 (Seite 104).
93. Schmuck C, Engels B, Schirmeister T, Fink R. (2008) Pearson Studium - Medizin: Chemie für Mediziner, ISBN-13: 978-3827372864 (Seite 654).
94. Tatake JG, Knapp MM, Ressler C. Synthesis and Characterization of Protein and Polylysine Conjugates of Sulfamethoxazole and Sulfanilic Acid for Investigation of Sulfonamide Drug allergy. *Bioconjugate chemistry*. 1991;2(2):124-132.
95. Märklbauer E, Meier R, Usleber E, Terplan G. Enzyme immunoassays for the detection of sulfamethazine, sulfadiazine, sulfamethoxypyridazine and trimethoprim in milk. *Food and Agricultural Immunology*. 1992;4:219-228.
96. Pastor-Navarro N, García-Rover C, Maquieira A, Puchades R. Specific polyclonal-based immunoassays for sulfathiazole. *Anal Bioanal Chem*. 2004;379(7-8):1088-1099.
97. Franek M, Diblikova I, Cernoch I, Vass M, Hruska K. Broad-Specificity Immunoassays for Sulfonamide Detection: Immunochemical Strategy for Generic Antibodies and Competitors. *Anal Chem*. 2006;78(5):1559-1567.
98. Zhang HY, Duan ZJ, Wang L, Zhang Y, Wang S. Hapten Synthesis and Development of Polyclonal Antibody-Based Multi-Sulfonamide Immunoassays. *J Agric Food Chem*. 2006;54(13):4499-4505.
99. Zhang SX, Wang ZH, Nesterenko IS, Eremin SA, Shen JZ. Fluorescence polarisation immunoassay based on a monoclonal antibody for the detection of sulphamethazine in chicken muscle. *Int J Food Sci Technol*. 2007;42(1):36-44.
100. Adrian J, Font H, Diserens JM, Sánchez-Baeza F, Marco MP. Generation of Broad Specificity Antibodies for Sulfonamide Antibiotics and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Analysis of Milk Samples. *J Agric Food Chem*. 2009;57(2):385-394.

101. Miao XS, Bishay F, Chen M, Metcalfe CD. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ Sci Technol*. 2004;38(13):3533-3541.
102. Song DA, Liu HJ, Zhang AQ, Qu JH. Fragmentation of typical sulfonamide drugs *via* heterolytic bond cleavage and stepwise rearrangement. *Rsc Adv*. 2014;4(89):48426-48432.
103. Roychowdhury S, Vyas PM, Reilly TP, Gaspari AA, Svensson CK. Characterization of the formation and localization of sulfamethoxazole and dapsone-associated drug-protein adducts in human epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;314(1):43-52.
104. Cribb AE, Nuss CE, Alberts DW, Lamphere DB, Grant DM, Grossman SJ, Spielberg SP. Covalent binding of sulfamethoxazole reactive metabolites to human and rat liver subcellular fractions assessed by immunochemical detection. *Chem Res Toxicol*. 1996;9(2):500-507.
105. Pestka JJ. High performance thin layer chromatography ELISAGRAM. Application of a multi-hapten immunoassay to analysis of the zearalenone and aflatoxin mycotoxin families. *J Immunol Methods*. 1991;136(2):177-183.
106. Yu JH, Chu FS. Immunochromatography of fusarochromanone mycotoxins. *J Assoc Off Agric Chem*. 1991;74(4):655-660.
107. Usuki S, O'Brien D, Rivner MH, Yu RK. A new approach to ELISA-based anti-glycolipid antibody evaluation of highly adhesive serum samples. *J Immunol Methods*. 2014;408:52-63.
108. Butcher NJ, Boukouvala S, Sim E, Minchin RF. Pharmacogenetics of the arylamine *N*-acetyltransferases. *Pharmacogenomics J*. 2002;2(1):30-42.
109. Kawamura A, Westwood I, Wakefield L, Long H, Zhang N, Walters K, Redfield C, Sim E. Mouse *N*-acetyltransferase type 2, the homologue of human *N*-acetyltransferase type 1. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(7):1550-1560.
110. https://ihss.humicsubstances.org/MSDS/IHSS_MSDS_1R101N.pdf abgerufen am 28.03.2017.
111. Paul A, Stösser R, Zehl A, Zwirnmann E, Vogt RD, Steinberg CEW. Nature and abundance of organic radicals in natural organic matter: Effect of pH and irradiation. *Environ Sci Technol*. 2006;40(19):5897-5903.
112. Kuhne M, Dippong M, Flemig S, Hoffmann K, Petsch K, Schenk JA, Kunte HJ, Schneider RJ. Comparative characterization of mAb producing hapten-specific hybridoma cells by flow cytometric analysis and ELISA. *J Immunol Methods*. 2014;413:45-56.
113. Oberleitner L, Dahmen-Levison U, Garbe LA, Schneider RJ. Improved strategies for selection and characterization of new monoclonal anti-carbamazepine antibodies during the screening process using feces and fluorescence polarization immunoassay. *Anal Methods*. 2016;8(38):6883-6894.

6. Anhang

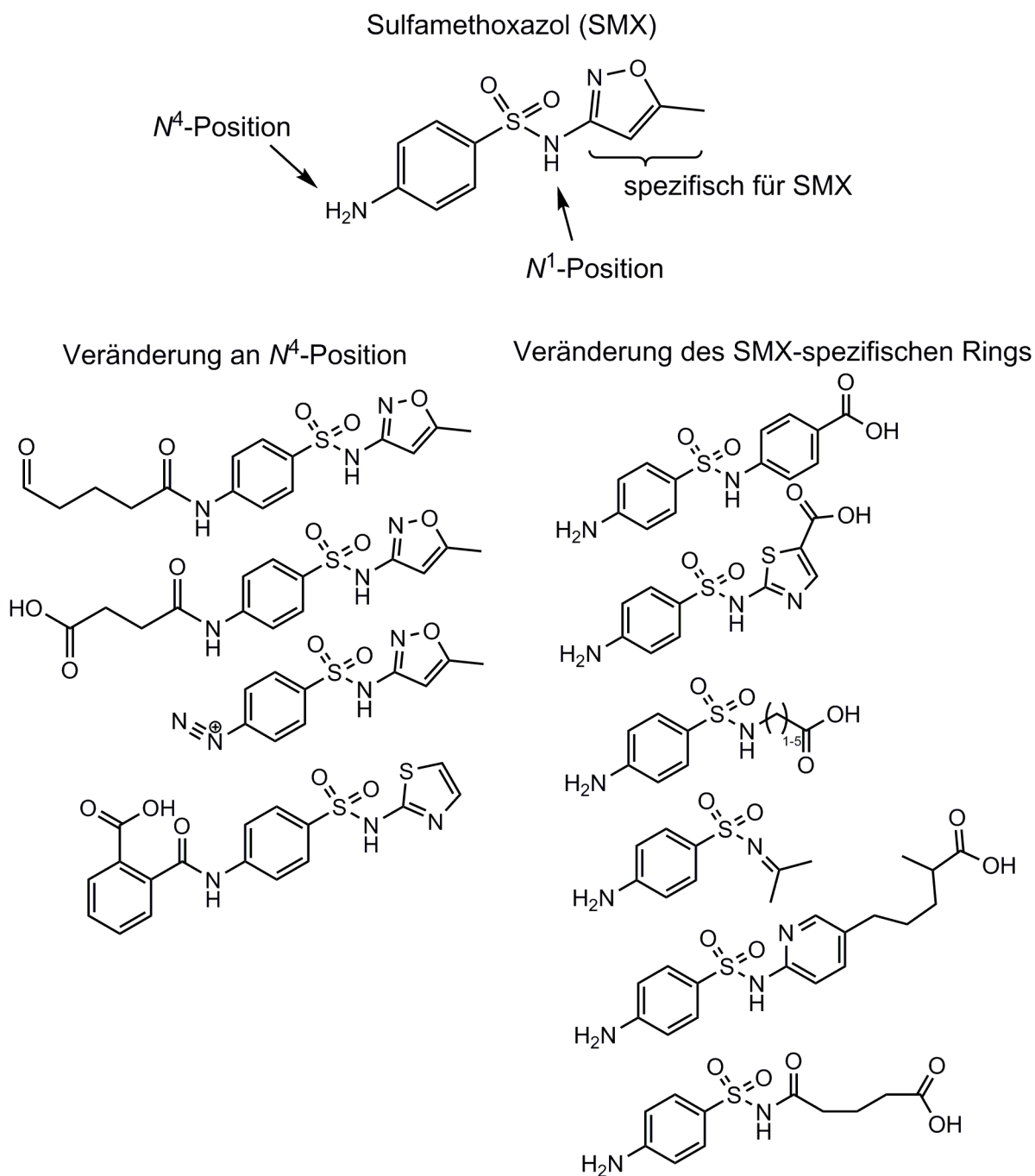


Abbildung A1: Darstellung von SMX und den in der Literatur bisher beschriebenen Haptenstrukturen zur Synthese von Immunogenen oder Tracer für SMX- und Sulfonamid-Immunoassays [94-100].

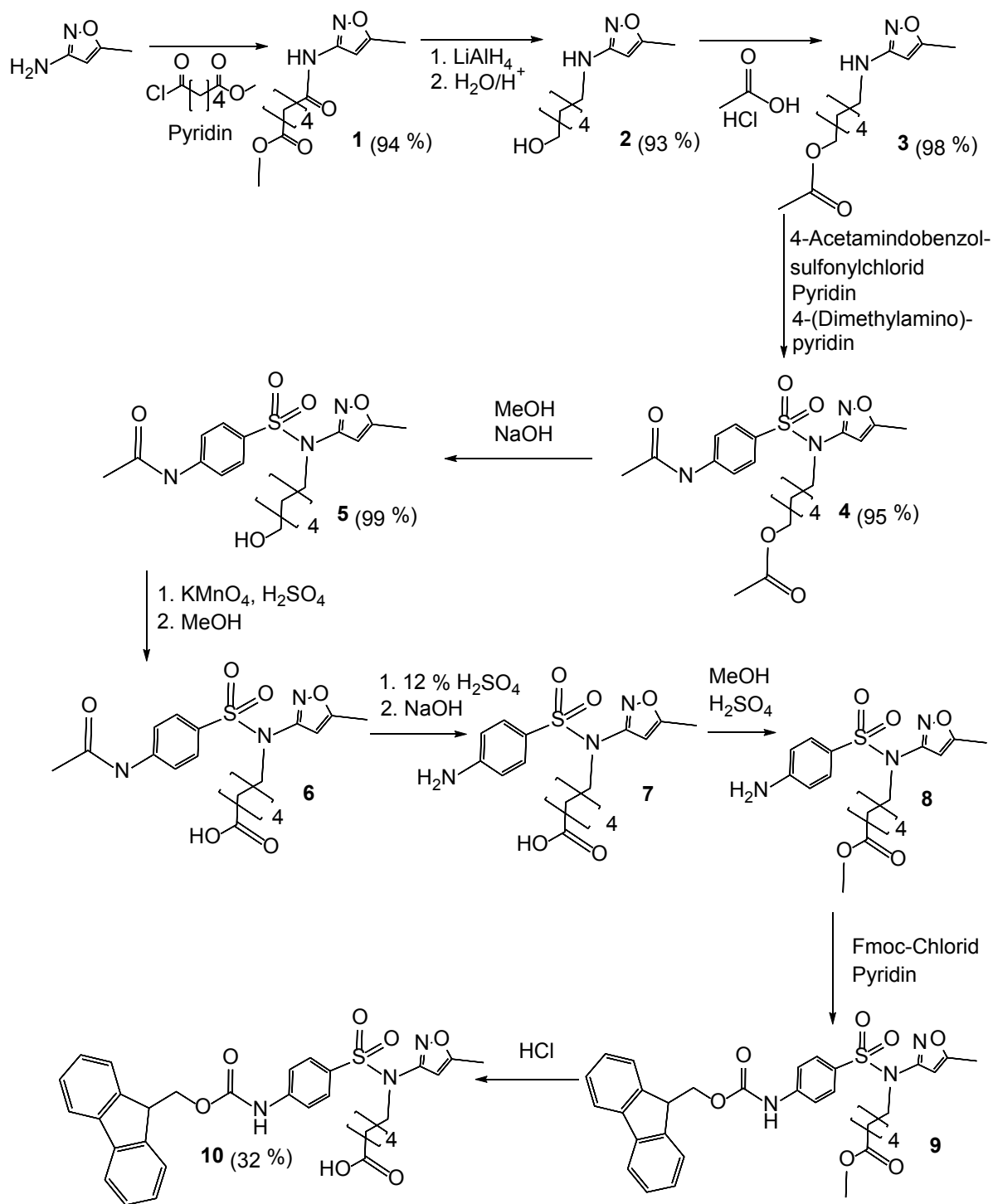


Abbildung A2: Vereinfachtes Reaktionsschema zur Darstellung des neuen mit Fmoc geschützten Haptens **10**, welches zur Synthese des neuen Tracers **13** und Immunogens **16** verwendet wurde.

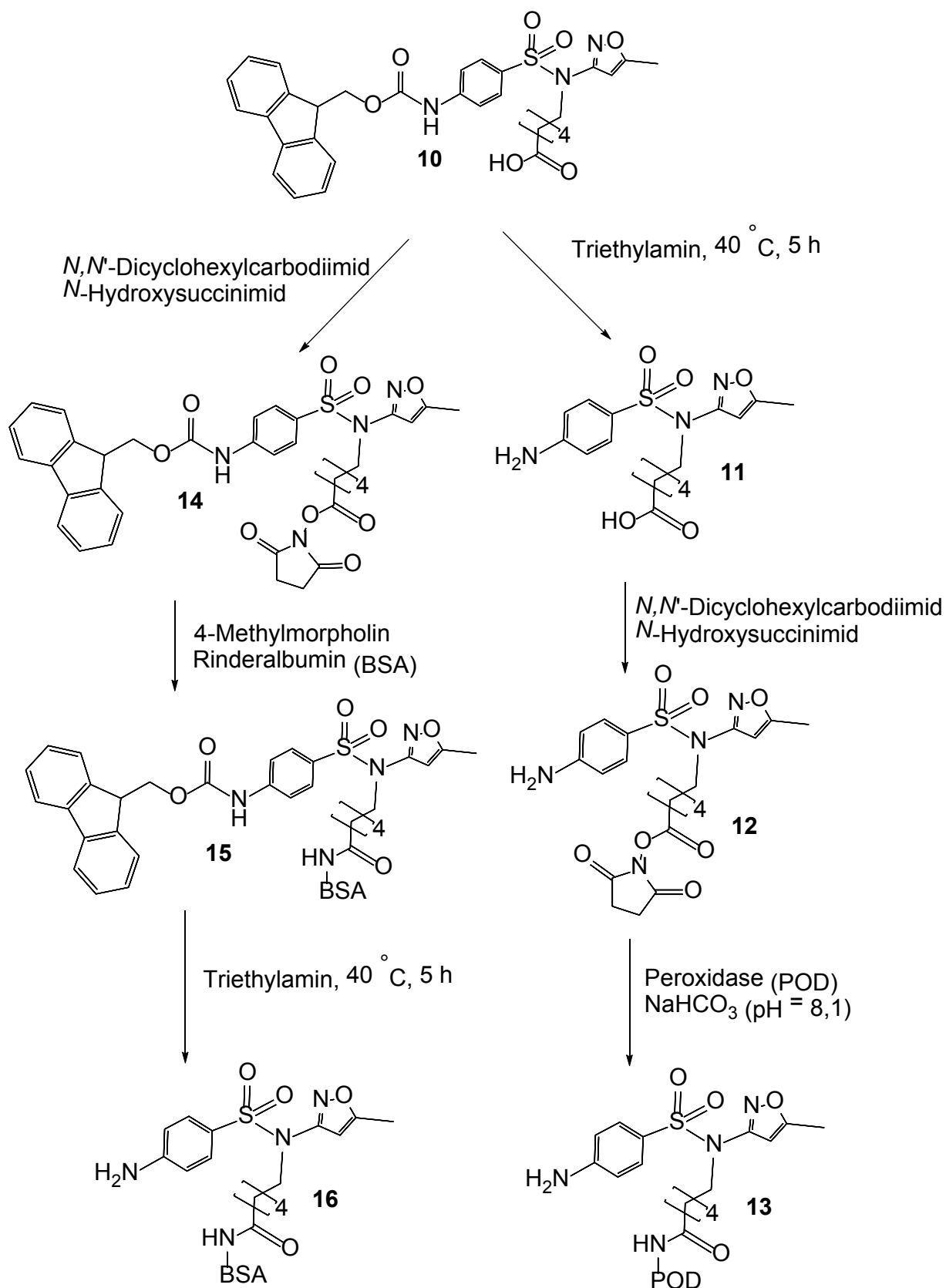


Abbildung A3: Vereinfachtes Reaktionsschema zur Darstellung des neuen Tracers **13** und Immunogens **16**.

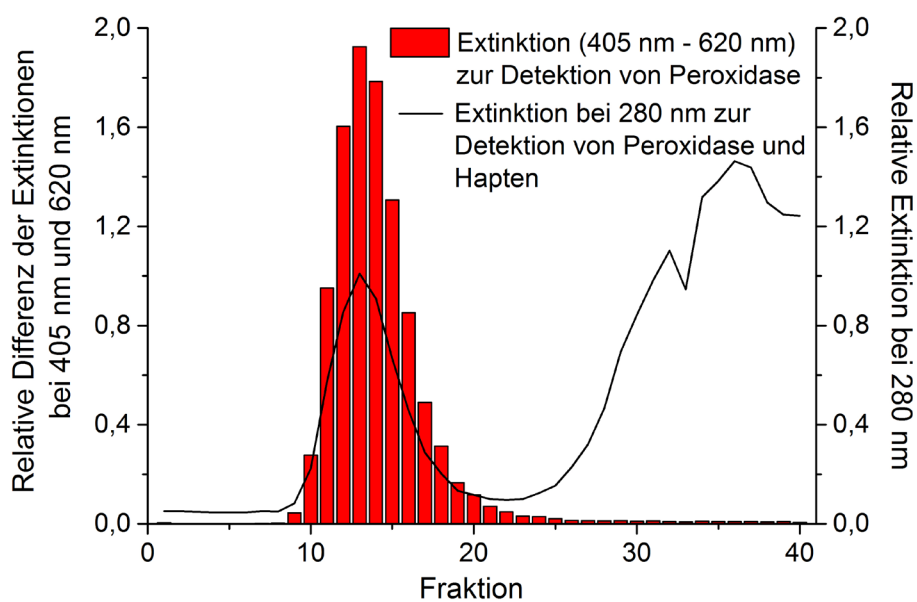


Abbildung A4: *Elutionsprofil bei Aufreinigung des Reaktionsansatzes zur Darstellung von 13 mittels Größenausschlusschromatographie (PD-10-Säule).*

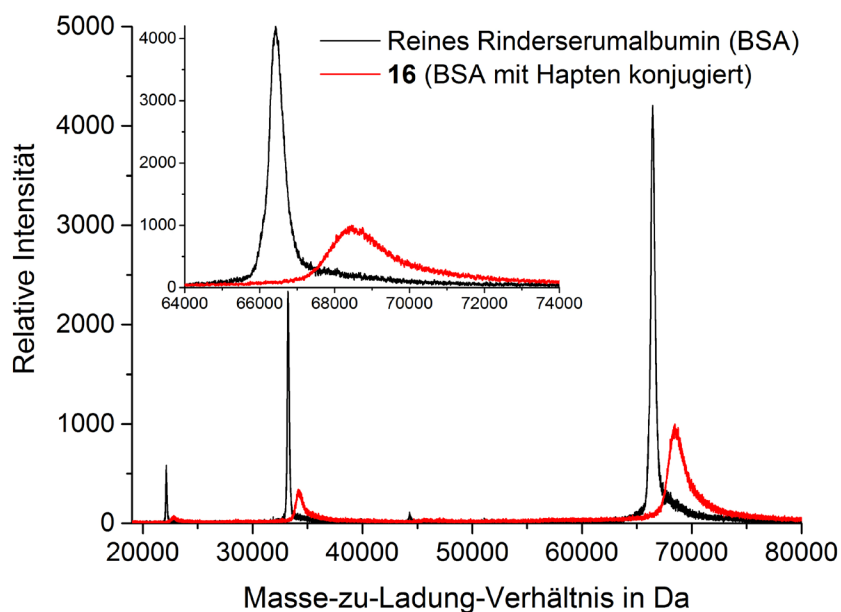


Abbildung A5: *MALDI-TOF-Massenspektrum für das Immunogen 16 und ungekoppelte Rinderserumalbumin.*

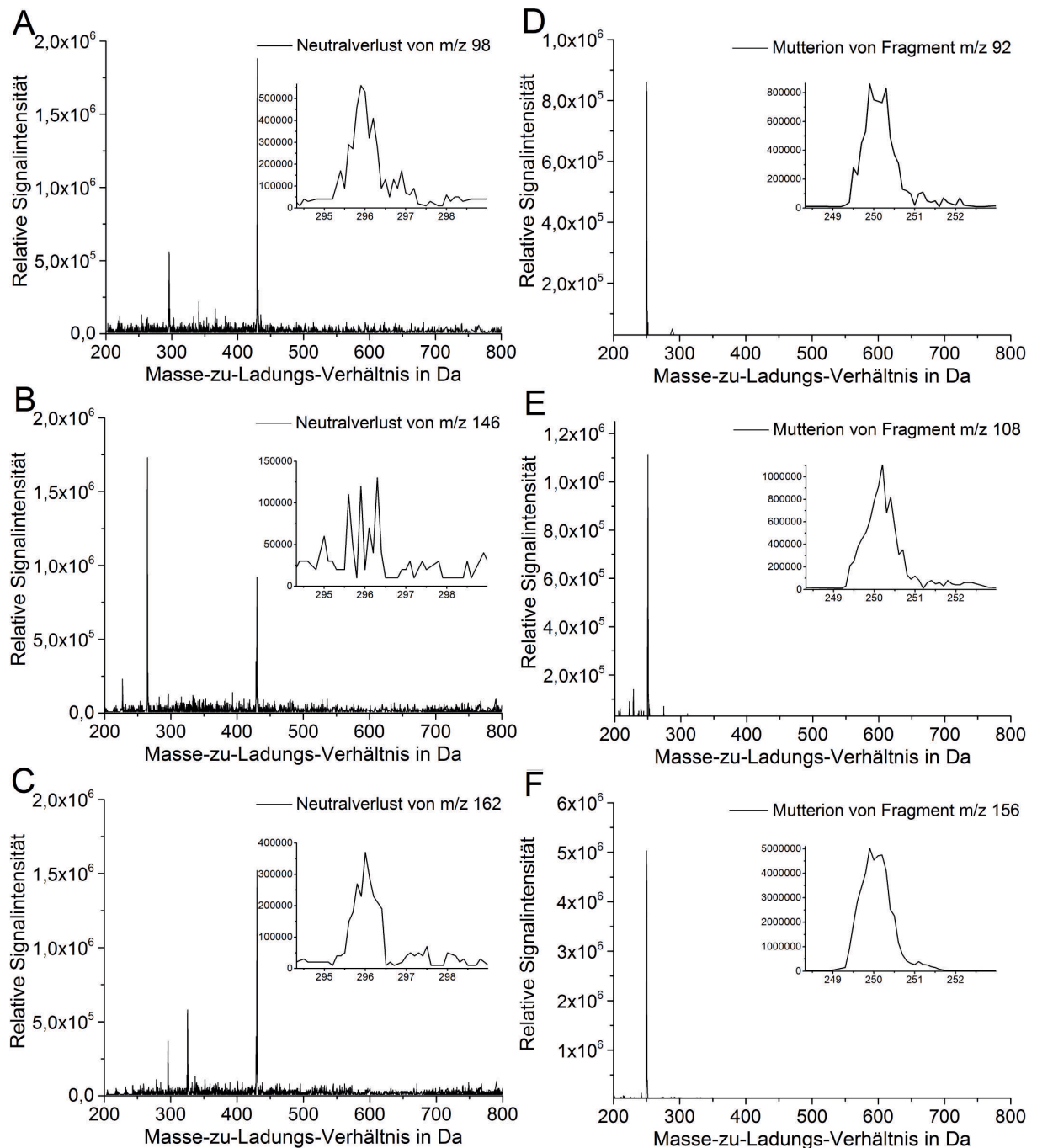


Abbildung A6: Massenspektrum (A-C) für den Fall 2 aus Abbildung 36 bei Vermessung der für SMX erhaltenen Neutralverluste. Gezeigt ist vergrößert das Signal bei einem m/z -Verhältnis von 296 für N^4 -Acetyl-SMX. (D-F) Massenspektrum für den Fall 1 aus Abbildung 36 bei Vermessung des Quasi-Moleküls der für SMX erhaltenen Fragmente. Gezeigt ist vergrößert das Signal bei einem m/z -Verhältnis von 250 für Sulfapyridin.

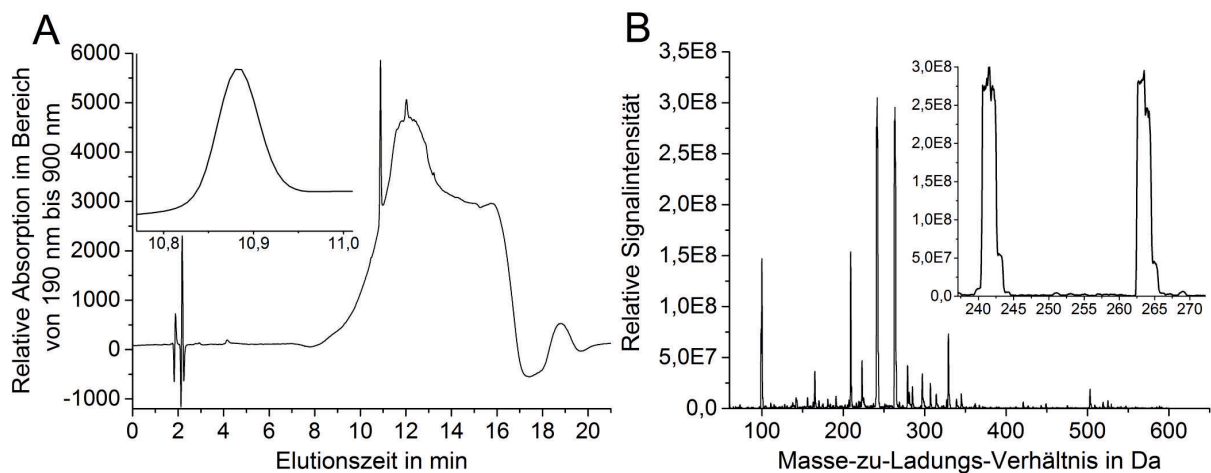


Abbildung A7: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,9 min erhaltenes Massenspektrum für **1** bei Verwendung der HPLC-Methode 1.

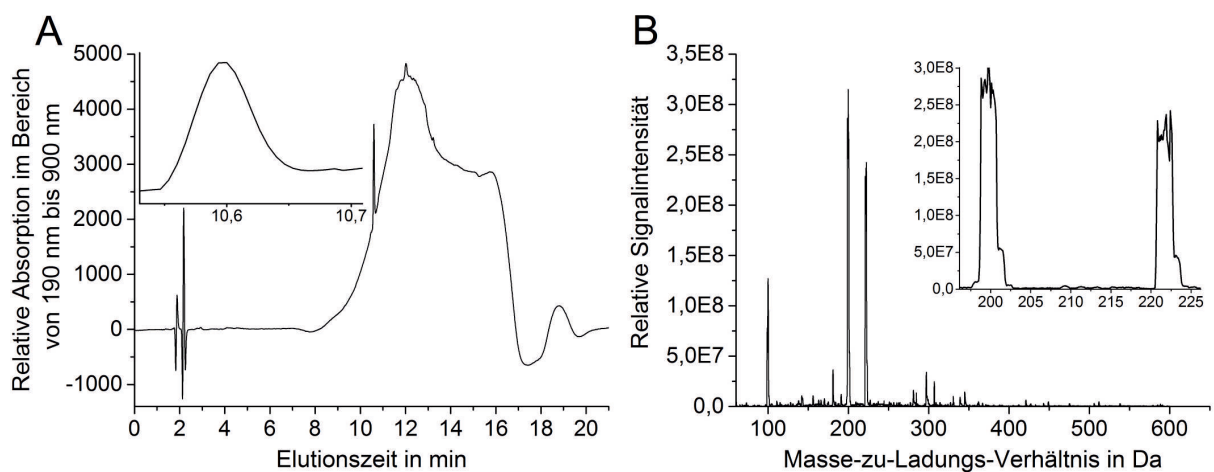


Abbildung A8: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,6 min erhaltenes Massenspektrum für **2** bei Verwendung der HPLC-Methode 1.

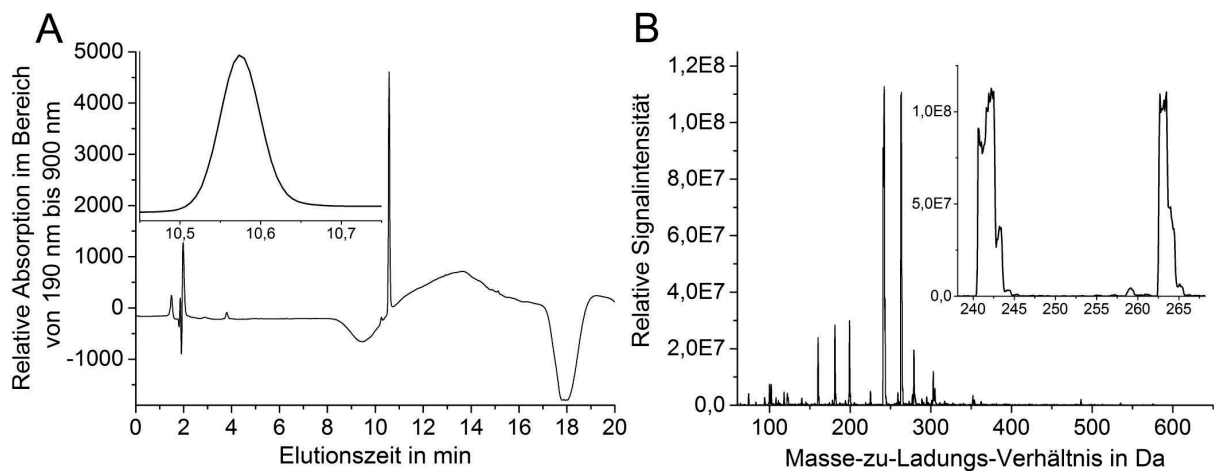


Abbildung A9: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,6 min erhaltenes Massenspektrum für **3** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

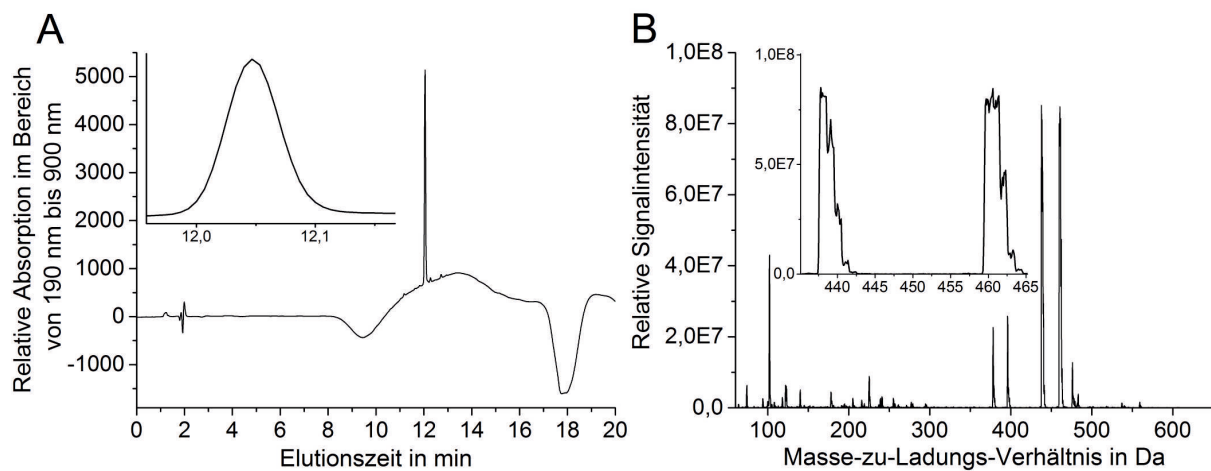


Abbildung A10: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 12,1 min erhaltenes Massenspektrum für **4** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

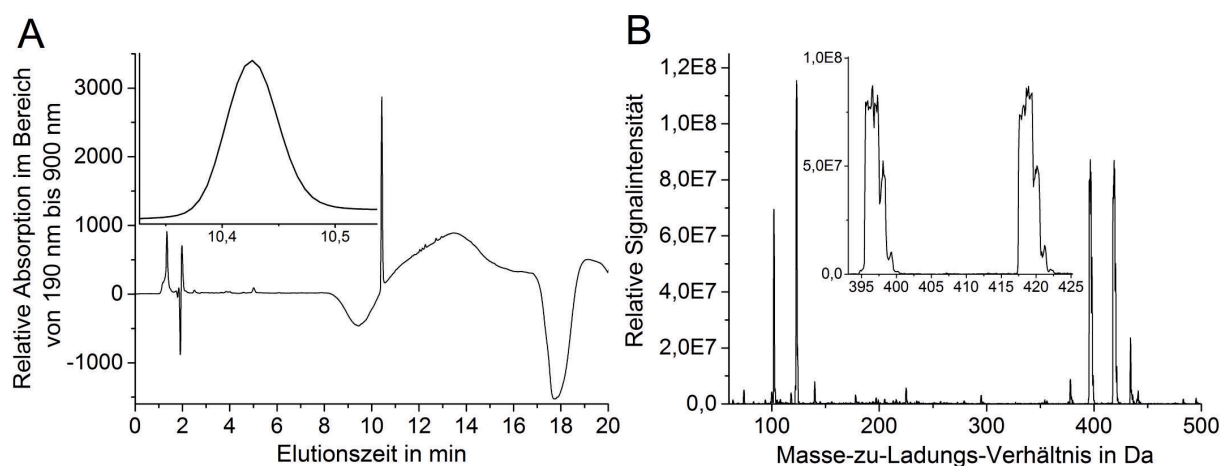


Abbildung A11: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,4 min erhaltenes Massenspektrum für **5** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

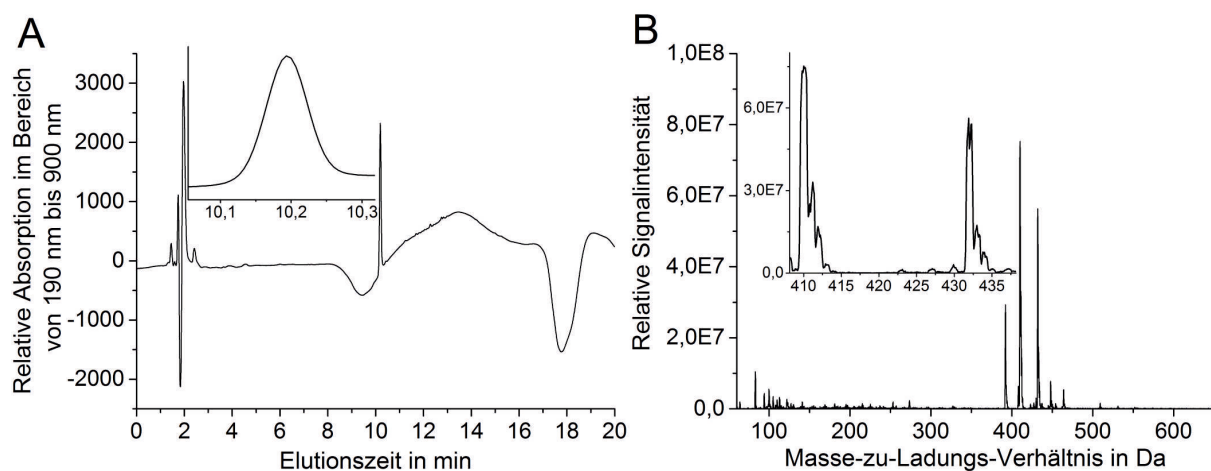


Abbildung A12: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,2 min erhaltenes Massenspektrum für **6** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

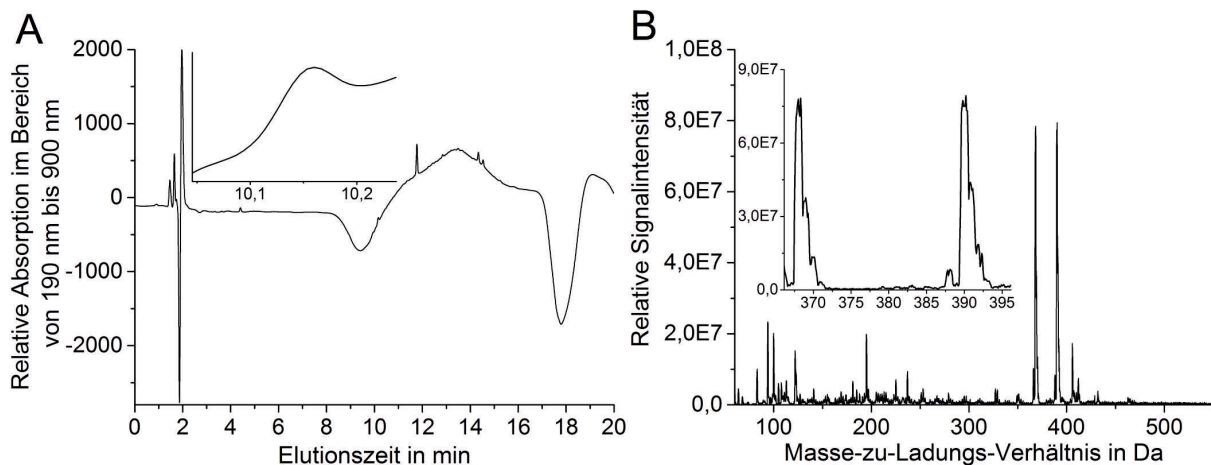


Abbildung A13: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 10,2 min erhaltenes Massenspektrum für **7** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

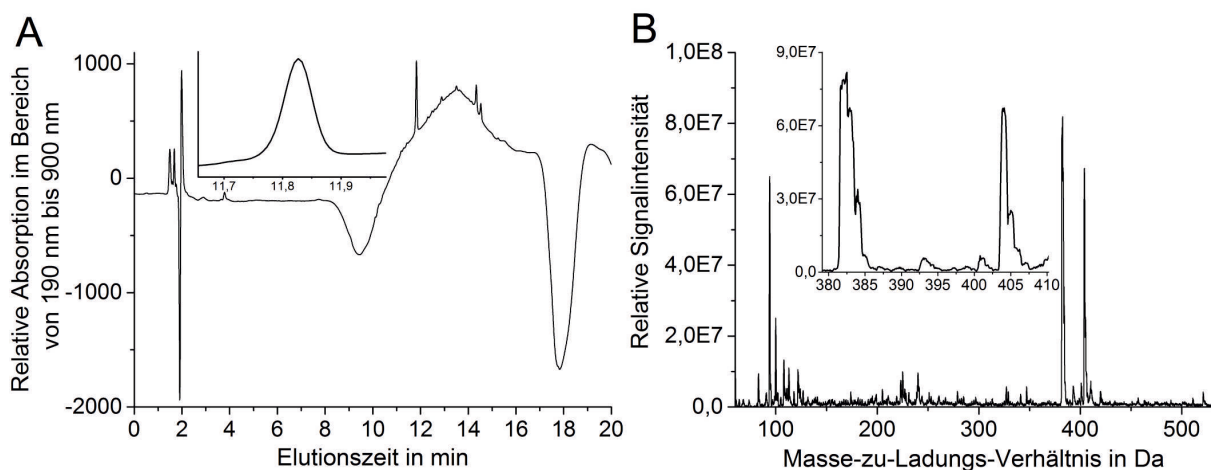


Abbildung A14: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 11,8 min erhaltenes Massenspektrum für **8** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

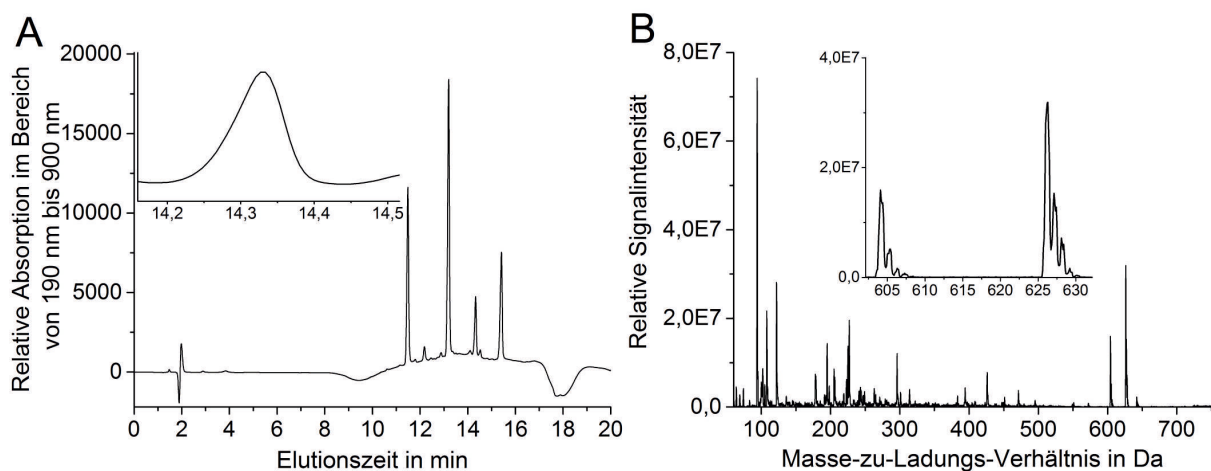


Abbildung A15: (A) UV-Chromatogramm und (B) für das Signal bei 14,3 min erhaltenes Massenspektrum für **9** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

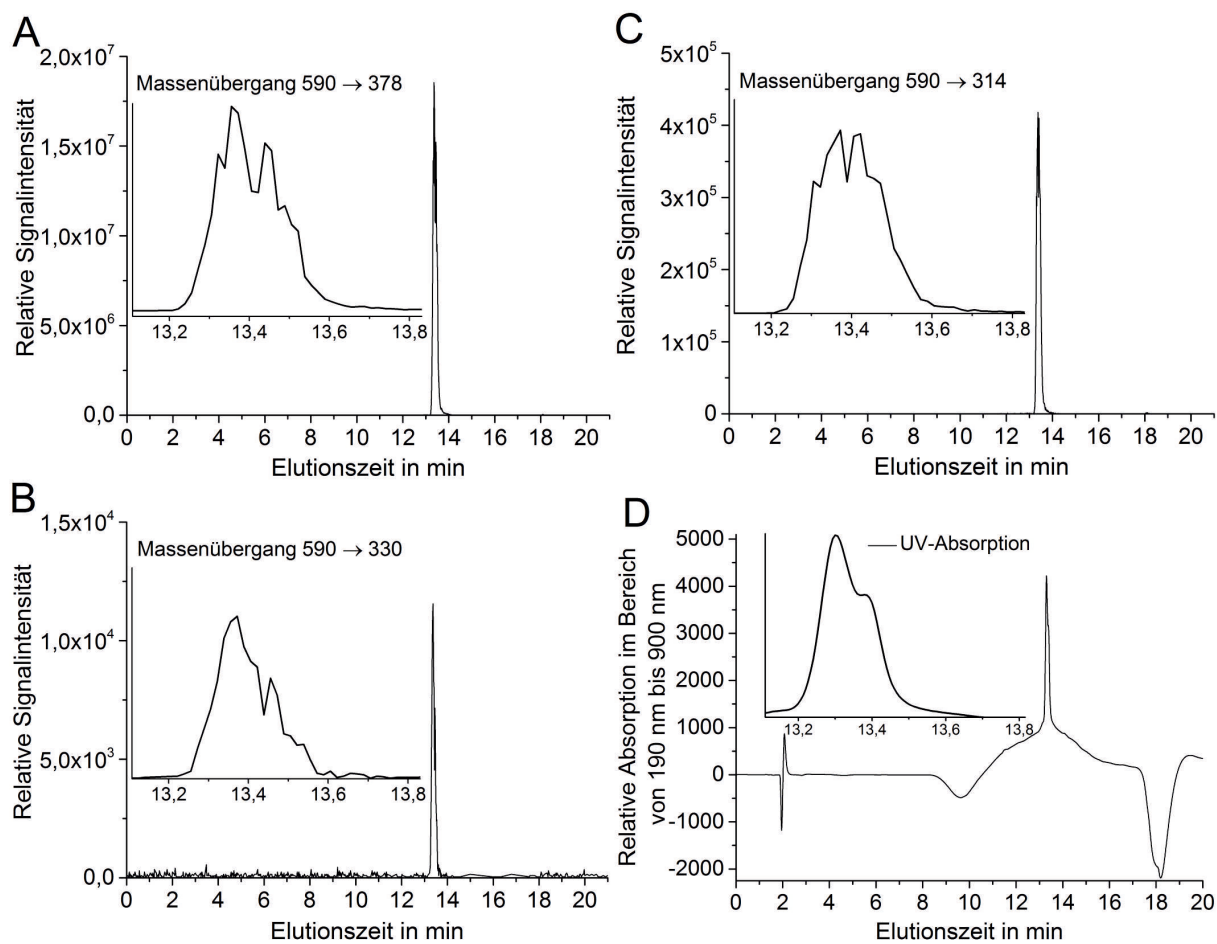


Abbildung A16: (D) UV-Chromatogramm und (A, B und C) erhaltene Signale für die erwarteten MRM-Übergänge für **10** bei Verwendung der HPLC-Methode 5.

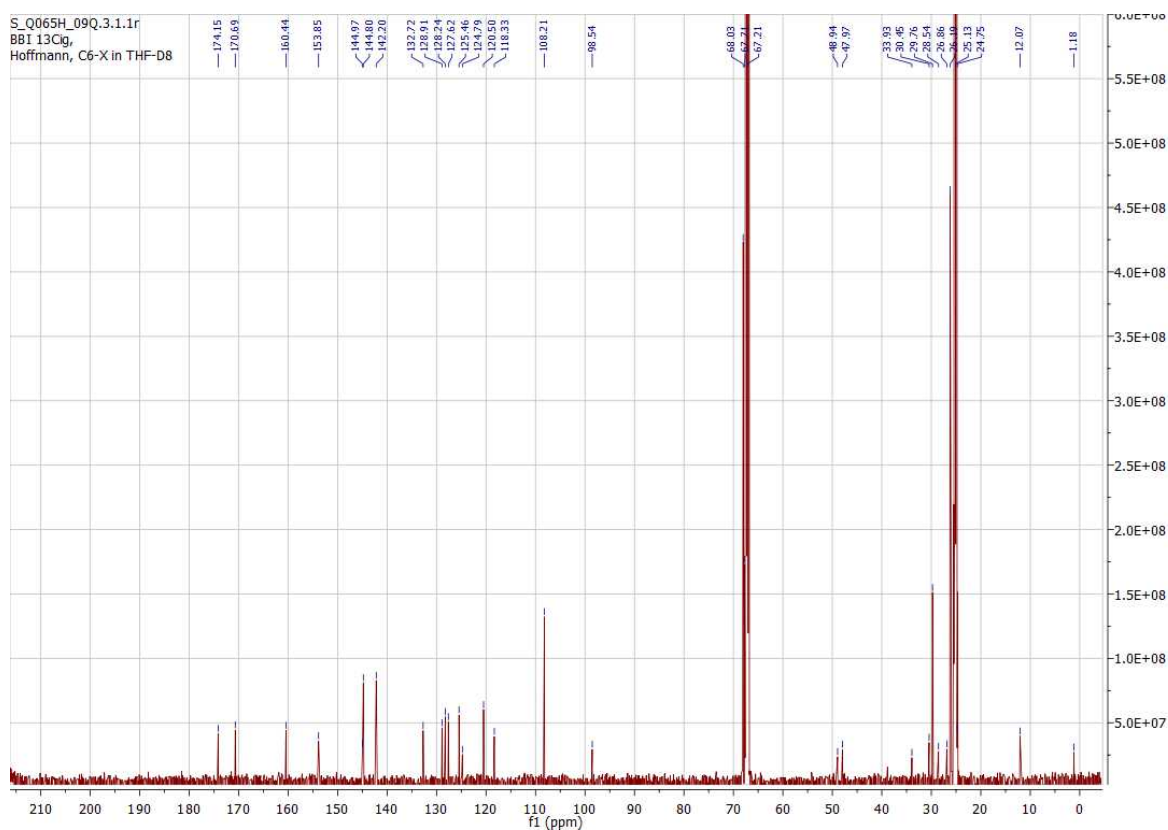
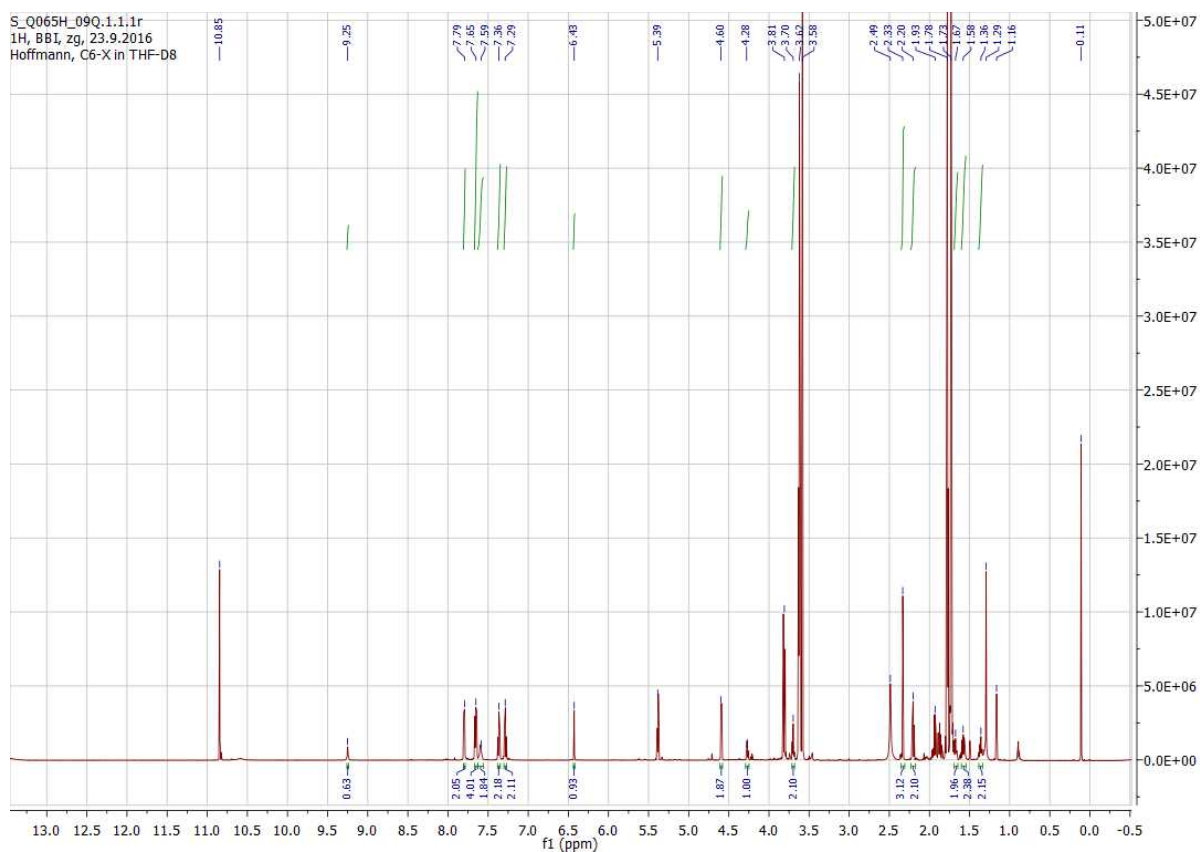


Abbildung A17: ^1H -NMR-Spektrum (oben) und ^{13}C -NMR-Spektrum (unten) für **10**.

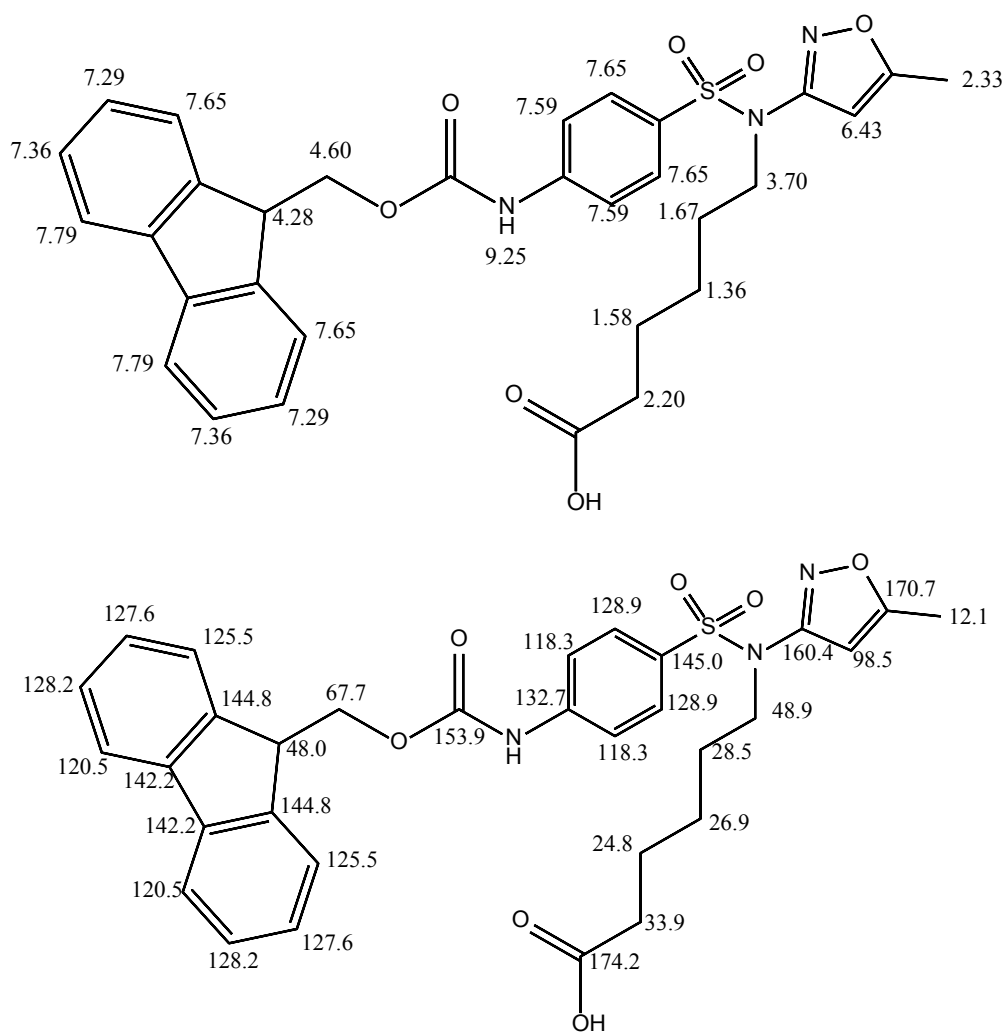


Abbildung A18: Zuordnung der Signale aus dem ^1H -NMR-Spektrum zu den entsprechenden Protonen (oben) und aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum zu den entsprechenden Kohlenstoffatomen (unten) für **10**.

Selbstständigkeitserklärung

„Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 126/2014 am 18.11.2014 angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.“

Berlin, den 18.10.2017

Holger Hoffmann